

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



TESIS DOCTORAL

Factores dietéticos, genéticos y fisiológicos de riesgo de anemia ferropénica, y eficacia de un alimento funcional en mujeres con deficiencia de hierro

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

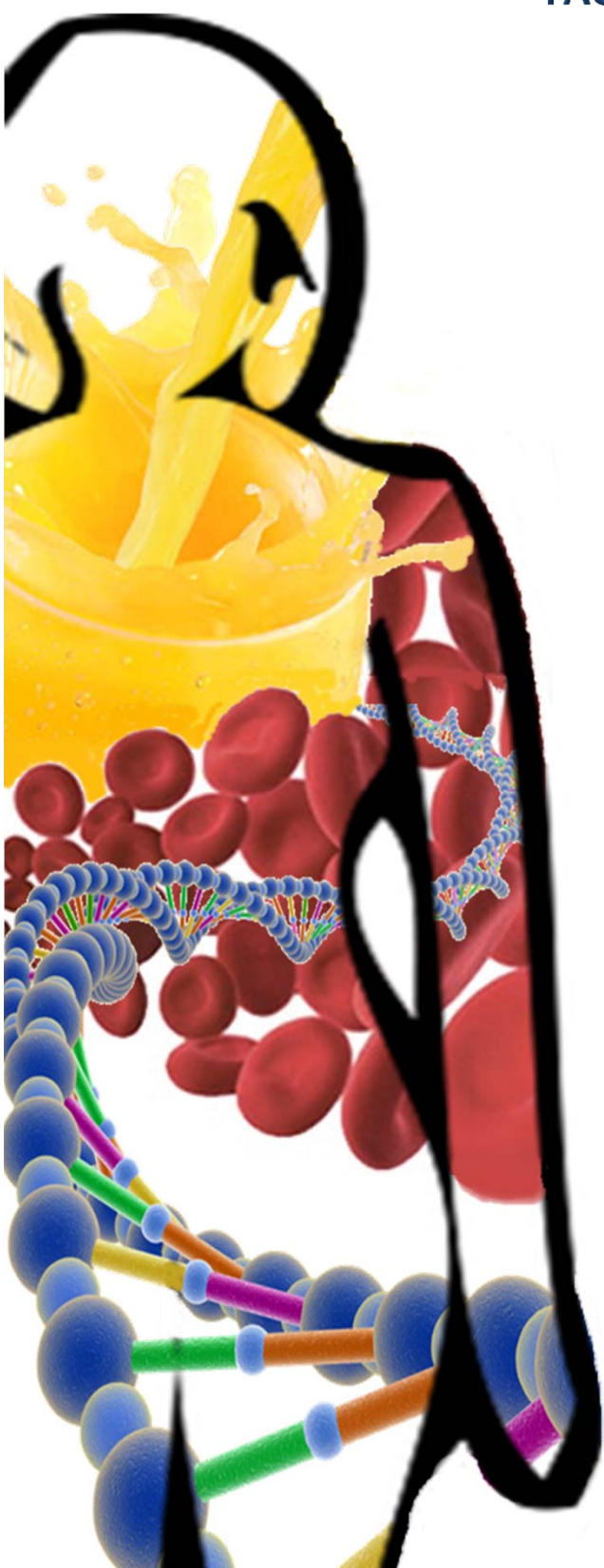
PRESENTADA POR

Ruth Blanco Rojo

Directoras

M^a Pilar Vaquero
Ana M^a Pérez Granados

Madrid, 2013



**FACTORES DIETÉTICOS, GENÉTICOS
Y FISIOLÓGICOS DE RIESGO DE
ANEMIA FERROPÉNICA,
Y EFICACIA DE UN ALIMENTO
FUNCIONAL EN MUJERES CON
DEFICIENCIA DE HIERRO**

RUTH BLANCO ROJO

Madrid, 2012



**Universidad Complutense
de Madrid**

Facultad de Farmacia

**Departamento de Nutrición
y Bromatología I**

**Consejo Superior de
Investigaciones Científicas**

**Instituto de Ciencia y
Tecnología de Alimentos y
Nutrición (ICTAN)**

**Departamento de
Metabolismo y Nutrición**

**Factores dietéticos, genéticos y
fisiológicos de riesgo de anemia
ferropénica, y eficacia de un alimento
funcional en mujeres con deficiencia de
hierro**

TESIS DOCTORAL

RUTH BLANCO ROJO

MADRID, 2012

Tesis Doctoral presentada por

Ruth Blanco Rojo

Aspirante al Grado de DOCTOR por la Universidad Complutense de Madrid, mención "Doctor Europeo"

Directoras de la Tesis Doctoral,

Dra. M^a Pilar Vaquero

Departamento de Metabolismo
y Nutrición

Instituto de Ciencia y
Tecnología de Alimentos y
Nutrición (CSIC)

Dra. Ana M^a Pérez Granados

Departamento de Metabolismo
y Nutrición

Instituto de Ciencia y
Tecnología de Alimentos y
Nutrición (CSIC)

Vº Bº DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Fdo. Dr. Baltasar Ruiz-Roso Calvo de Mora

Este trabajo de investigación ha sido realizado con ayuda de una beca Jae-Predoctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

También ha sido financiado de dos proyectos del Plan Nacional: "Biodisponibilidad de hierro de bebidas enriquecidas con sales ferrosas y aplicación en mujeres con predisposición a anemia" (BEBIDA-HIERRO-FUNCIONAL), (AGL 2006-09519/ALI) e "Interacción entre los factores nutricionales y genéticos en la etiología de la ferropenia. Respuesta a un alimento funcional" (NUTRICIÓN-GENÉTICA-HIERRO), (AGL 2009-11437).

Asimismo ha contado con financiación de la Empresa Grupo Leche Pascual, a través del proyecto de investigación: "Valoración en humanos de la actividad funcional de un alimento enriquecido".

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica:
la voluntad.*

Albert Einstein (1879-1955)

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al esfuerzo, la colaboración y el apoyo de muchas personas, a las cuáles me gustaría dar las gracias...

En primer lugar, mis Directoras de Tesis, las doctoras Pilar Vaquero y Ana Pérez-Granados. Quiero agradeceros vuestro cariño y dedicación, y la gran formación que he recibido durante estos años. Sin duda he aprendido muchísimo, no sólo a nivel científico sino también a nivel personal.

Pilar, gracias por ese voto de confianza que me diste desde el primer día, por escuchar siempre mis opiniones y por darme la oportunidad de participar en congresos, cursos, publicaciones... También por trasmitirme el amor por la Ciencia, y por enseñarme, con tu ejemplo, que con esfuerzo y ganas uno puede conseguir cualquier objetivo que se proponga.

Ana, no tendría espacio suficiente para agradecerte tantas cosas... Quiero destacar tu gran dedicación y capacidad formativa, que ha abarcado desde la rotulación del primer tubo hasta las últimas correcciones de la tesis. Y tu cariño, siempre has estado ahí cuando te he necesitado, con unas palabras de ánimo, unas risas o un buen consejo. Gracias *amore*.

A Laura Toxqui e Ione Wright, a las cuales tuve el gusto de conocer como compañeras de grupo pero cuya amistad espero que perdure siempre. Laurita, estuviste ahí desde el principio y puedo decir que poco a poco ganaste mi corazón. Esto sin ti no habría sido posible, tanto por tu trabajo como por todo el apoyo moral que siempre me has dado. Ione, gracias por iniciarme en el maravilloso mundo de la estadística, y por supuesto, por tu inestimable ayuda con el inglés. También me gustaría agradecer la labor de Jorge Parra, Leticia, Itxaso, María Paramés, Rocío, Elena y María Chocano, que aunque estuvieron de paso me ayudaron muchísimo, especialmente con la valoración de las dietas.

A toda la gente del laboratorio, gracias por vuestro compañerismo y amistad, y por todos los buenos ratos que hemos pasado. Belén, la chica de la sonrisa perenne, gracias por tu energía y buen humor. Tamara, que ha compartido de cerca "el sufrimiento", verás como todo llega. Fátima, gracias por tus palabras de ánimo en los momentos de flaqueza. También quiero dar las gracias a Jorge Mujico, Tati, María Hidalgo, Gonzalo, Sonia, Ana Veses, Alina, Espe y Aurora, siempre dispuestos a echar una mano.

A Javi Romeo, cómo olvidarte, gracias por tu gran corazón y generosidad.

Igualmente me gustaría dar las gracias a todas las personas cuya colaboración ha sido imprescindible para el desarrollo de esta Tesis. A Sara, la enfermera, por su disponibilidad, simpatía y buen hacer. A Carmen González Vizcayno, que tan amablemente nos permitió realizar la intervención en sus instalaciones, gracias por tu paciencia. Al laboratorio de Genética Forense y Genética de Poblaciones de la UCM, dar las gracias especialmente a Ana, Carlos y Eduardo, sin los cuales la parte de genética de la tesis no hubiera sido posible. A Stefania Bertoncini, gracias por tu esfuerzo y dedicación. También agradezco a la Unidad de Bioinformática del Sant Pau la ayuda prestada en el tratamiento estadístico de los datos genéticos. A Concha de la Piedra y a Pilar Zazo, que me han ayudado en la parte de metabolismo óseo. A Laura Barrios, del CTI del CSIC, por solucionar nuestros problemas con la estadística. Al Departamento de Biología Molecular de la *University College of London*, donde tuve la suerte de realizar una estancia. A Kaila y a Henry, que dirigieron mi trabajo allí, y también a toda la gente que me ayudó y me hizo sentir integrada desde el primer día: Sara, Rumeza y Mina.

A Ángeles Carbajal, gracias a la cuál conocí a Pilar y que siempre ha respondido con rapidez y amabilidad todas mis demandas. También a Santi y Stefanie, mis predecesores, gracias por vuestros consejos y vuestra ayuda en la distancia.

A mis voluntarias, sin las cuales no podría haber realizado esta Tesis Doctoral.

Por último, quiero dar las gracias a todas las personas que habéis estado conmigo todos estos años, apoyándome y preocupándoos por mí.

Mis amigos: Jessy (mi cobaya favorita), Fernan, Jorge, Luisma, Rubén, Fer Bosch, Davide, Hire, Iciar, Lola, Ale, Héctor, Rosa, "los aeronáuticos"...Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado.

A Marta y Rafa. Martus, primero gracias por ayudarme a decidir apuntarme al doctorado, y por las horas y horas de charla y aguante! Eres un ejemplo de superación, y estoy segura de que llegarás a ser una gran Médica y Doctora. Y Rafa, gracias por tu cariño y por intentar entendernos!

A mi familia, especialmente a mis padres. Esta Tesis va dedicada a vosotros, por enseñarme el valor del esfuerzo y por haberme apoyado siempre en mis decisiones. A mi hermana Nuria, gracias por preocuparte por tu hermanuchi. A mi abuela Loli y a mi yaya Sole, que tan orgullosas están de su nieta. A mi tíos Jose, Marga, Juan, Beatriz, Araceli y Paloma; y a mi primos Víctor, Natasha y Amanda. También quiero dar las gracias a mi familia política, Mimar, Toni, Pepita, María, Sara, Paco, Vir, Jesús y a la pequeña Sara.

A José Antonio, a quien tengo que dar gracias por tantas y tantas cosas que es imposible plasmarlo en unas líneas... Gracias por estar siempre a mi lado, por lo que hemos vivido y por lo que nos queda por vivir.

Espero no olvidarme de nadie. A todos vosotros...

GRACIAS!

A mis padres, Juan José y Raquel

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
INTERÉS Y OBJETIVOS.....	7
INTRODUCCIÓN	15
1 Funciones y distribución del hierro en el organismo.....	17
1.1 Funciones del hierro	17
1.2 Distribución del hierro.....	18
2 Metabolismo del hierro	20
2.1 Absorción de hierro	20
2.1.1 Absorción de hierro no hemo o inorgánico.....	21
2.1.2 Absorción de hierro hemo	24
2.1.3 Transporte y almacenamiento de hierro intracelular	25
2.1.4 Transferencia de hierro a la circulación	25
2.1.5 Regulación de la absorción de hierro	26
2.1.5.1 Regulación vía proteínas reguladoras de hierro (IRP)	26
2.1.5.2 Regulación mediante el factor inducible de hipoxia (HIF)	27
2.2 Transporte de hierro y captación a nivel celular.....	27
2.3 Utilización de hierro: Eritropoyesis	30
2.4 Reciclado de hierro.....	30
2.5 Almacenamiento	32
3 Regulación de la homeostasis del hierro	34
3.1 Hepcidina	34
3.2 Regulación de la hepcidina	37
3.2.1 Regulación por los niveles de hierro circulante.....	37
3.2.2 Regulación por los almacenes de hierro	39
3.2.3 Regulación por señales eritropoyéticas	40
3.2.4 Regulación a través del factor inducible de hipoxia (HFI)	41
3.2.5 Regulación por estados de inflamación o infección	41

4	Variantes genéticas implicadas en el metabolismo del hierro	42
4.1	Alteraciones del metabolismo del hierro de origen genético.....	42
4.1.1	Variantes genéticas que causan sobrecarga de hierro.....	42
4.1.1.1	Hemocromatosis hereditaria o hemocromatosis tipo 1	43
4.1.1.2	Hemocromatosis juvenil o hemocromatosis tipo 2	44
4.1.1.3	Hemocromatosis por mutaciones del TfR2 o hemocromatosis tipo 3	45
4.1.1.4	Sobrecarga de hierro por alteración de la ferroportina o hemocromatosis tipo 4.....	45
4.1.2	Variantes genéticas que causan deficiencia de hierro	46
4.1.2.1	Anemia ferropénica refractaria (IRIDA)	46
4.1.2.2	Hipotransferrinemia.....	46
4.1.2.3	Deficiencia de DMT-1.....	47
4.1.2.4	Aceruloplasminemia	47
4.2	Estudios de asociación y expresión genética.....	47
4.2.1	Tipos de variantes genéticas.....	47
4.2.2	Estudios de asociación genética.....	48
4.2.3	Estudios de expresión genética	50
5	Deficiencia de hierro y anemia ferropénica	51
5.1	Definición y etapas	51
5.2	Marcadores de diagnóstico	52
5.2.1	Índices del estado de los glóbulos rojos.....	53
5.2.1.1	Hemoglobina	53
5.2.1.2	Hematocrito y número de hematíes	53
5.2.1.3	Volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media.	53
5.2.1.4	Índice de distribución de hematíes	54
5.2.2	Ferritina sérica	54

5.2.3 Hierro sérico	55
5.2.4 Transferrina y saturación de la transferrina	55
5.2.5 Receptor soluble de transferrina	56
5.2.6 Zinc protoporfirina eritrocitaria	57
5.2.7 Almacenes de hierro del organismo (<i>Body iron</i>)	57
5.3 Prevalencia y grupos de riesgo.....	57
5.4 Consecuencias para la salud	60
5.4.1 Capacidad de trabajo físico	60
5.4.1.1 Capacidad aeróbica, resistencia y actividad voluntaria.....	61
5.4.1.2 Productividad económica	61
5.4.2 Consecuencias neuropsicológicas	62
5.4.3 Inmunidad y enfermedades infecciosas.....	63
5.4.4 Comorbilidad y relación con otras enfermedades.....	63
6 Prevención y tratamiento nutricional de la deficiencia de hierro	65
6.1 Biodisponibilidad del hierro: concepto y factores que influyen	65
6.1.1 Factores dietéticos	65
6.1.1.1 Hierro	65
6.1.1.2 Otros componentes de los alimentos: potenciadores e inhibidores.....	66
6.1.2 Factores propios del individuo	71
6.2 Ingestas recomendadas de hierro.....	71
6.3 Prevención nutricional de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica.....	74
6.3.1 Intervenciones dietéticas	74
6.3.2 Alimentos fortificados	76
6.3.3 Nuevas perspectivas: Genómica nutricional.....	82

RESUMEN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS Y DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA.....	85
1 Estudios realizados.....	88
2 Resumen de la metodología empleada	90
2.1 Sujetos.....	90
2.2 Recogida de muestras	90
2.2.1 Recogida de sangre y orina.....	90
2.2.2 Parámetros hematológicos y bioquímicos del estado del hierro ..	91
2.2.3 Parámetros del metabolismo lipídico, metabolismo de la glucosa y marcadores de inflamación.....	91
2.2.4 Determinaciones específicas sobre el estado de la vitamina D y el metabolismo óseo	91
2.3 Identificación de factores de riesgo genéticos asociados a fenotipos de deficiencia de hierro y anemia ferropénica	92
2.3.1 Selección de SNPs	92
2.3.2 Extracción de ADN.....	92
2.3.3 Genotipado de las muestras.....	92
2.4 Estudio de la expresión del gen de la transferrina en función de los diferentes alelos del SNP rs3811647.	93
2.4.1 Construcción de plásmidos y realización de mutagénesis dirigida (<i>site-directed mutagenesis</i>).....	93
2.4.2 Cultivo celular, transfección y ensayo de la luciferasa	93
2.5 Valoración de la dieta	93
2.6 Medidas antropométricas, determinación de la presión arterial y de la actividad física, y cuestionarios sobre salud general	94
2.7 Valoración de las pérdidas menstruales	94
2.8 Diseño y realización de la intervención nutricional con un zumo fortificado con hierro	95

PUBLICACIONES	97
1 Cuatro variantes en los genes de la transferrina y del HFE como marcadores potenciales del riesgo de anemia por deficiencia de hierro: estudio de asociación en mujeres menstruantes.	99
2 El SNP intrónico rs3811647 del gen de la transferrina humano, modula su expresión en células hepáticas.....	109
3 La ingesta de carne roja pero no de carne blanca o de productos cárnicos se asocia con mayores almacenes de hierro en mujeres españolas en edad fértil.....	121
4 Eficacia de un zumo de frutas fortificado con pirofosfato férrico microencapsulado: estudio aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo en mujeres españolas con deficiencia de hierro.....	149
5 Relación entre la vitamina D, el remodelado óseo y el estado de hierro en mujeres jóvenes con deficiencia de hierro que consumen un alimento fortificado con hierro.	159
RESULTADOS NO PUBLICADOS	171
1 Asociación entre la presencia del SNP rs3811647 y la respuesta a la ingesta de un alimento fortificado con hierro en mujeres con deficiencia de hierro.	173
2 Determinación de las pérdidas menstruales y del uso de anticonceptivos hormonales en un grupo de mujeres en edad fértil y asociación con su estado de hierro.	175
3 Relación entre la presencia del SNP rs3811647, el uso de anticonceptivos hormonales y la ingesta de hierro hemo, y los parámetros del estado del hierro en mujeres con predisposición a anemia ferropénica	179
DISCUSIÓN GENERAL	183
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	193
BIBLIOGRAFÍA.....	199

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AA	Ácido ascórbico
Dcytb	<i>Duodenal cytochrome B</i>
DMT-1	<i>Divalent metal transporter</i> /Transportador de metales divalentes
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i> /Requerimiento Medio Estimado
FPN	Ferroportina
Ft	Ferritina
GWAs	<i>Genome-wide association studies</i> /Estudios de genotipado masivo
<i>HAMP</i>	Gen de la hepcidina
Hb	Hemoglobina
HCP-1	<i>Heme carrier protein</i> / Proteína transportadora de hierro hemo
HIF	<i>Hipoxia-inducible factor</i> / Factor inducible de hipoxia
Hjv	Hemojuvelina
Hp	Hepastina
HREs	<i>Hipoxia-responsive elements</i> / Elementos sensibles de hipoxia
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
IREs	<i>Iron-responsive elements</i> /Elementos sensibles de hierro
IRPs	<i>Iron-regulatory proteins</i> /Proteínas reguladoras de hierro
MAF	<i>Minor allele frequency</i> /Frecuencia de alelo menor
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i> /Ingestas Recomendadas
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i> /Polimorfismo de un solo nucleótido
sTfR	Receptor soluble de transferrina
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina
TMPRSS6	Matriptasa
TS	Saturación de la transferrina
VCM	Volumen corpuscular medio
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> /Organización Mundial de la Salud
ZnPP	Zinc protoporfirina

RESUMEN/SUMMARY

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, y es la principal causa de anemia. Es un trastorno multifactorial en el que intervienen la alimentación, la situación fisiológica y la carga genética del individuo.

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de los factores dietéticos, genéticos y fisiológicos de riesgo de anemia ferropénica, y en la valoración de la eficacia de un alimento funcional en mujeres con deficiencia de hierro. Para ello, se llevó a cabo un estudio de asociación entre diferentes variantes genéticas y parámetros del metabolismo del hierro en 270 mujeres Caucásicas en edad fértil, y posteriormente se realizó un estudio de expresión de la variante genética más relevante. También se realizó la valoración de la ingesta habitual de alimentos, energía y nutrientes en un grupo de estas mujeres y se estimaron sus pérdidas menstruales, relacionándose todo ello con su estado de hierro. Además, se estudió el efecto del consumo, como parte de la dieta habitual, de un zumo fortificado con hierro frente a un zumo sin fortificar (placebo) sobre el metabolismo de hierro y el remodelado óseo de un grupo de 122 mujeres con riesgo de anemia ferropénica, y se quiso conocer si existía alguna interacción dieta-gen. Por último, se determinó la influencia conjunta de factores clave de tipo dietético, genético y fisiológico en los parámetros del metabolismo del hierro en este grupo poblacional.

Los resultados obtenidos indican que cuatro SNPs, dos en el gen de la transferrina (rs3811647 y rs1799852) y otros dos en el gen del HFE (C282Y y H63D), explican el 35% de la variabilidad genética de la transferrina sérica en mujeres en edad fértil. Las portadoras del alelo minoritario del SNP rs3811647 presentan mayores niveles de transferrina sérica y menores de saturación de la transferrina, lo que implicaría mayor riesgo de anemia ferropénica, aunque la presencia simultánea de los otros SNPs parece tener un efecto compensatorio. El estudio de expresión revela que el alelo mutado del SNP intrónico rs3811647, aumenta la expresión del gen de la transferrina, lo que podría explicar los elevados niveles de la proteína transportadora de hierro encontrados en las mujeres portadoras de dicha mutación. El estudio de los factores dietéticos muestra que la ingesta de hierro total no se relaciona con ningún parámetro del estado de hierro en mujeres en edad fértil; sin embargo,

la ingesta de hierro hemo, altamente biodisponible, es el principal factor dietético que condiciona los almacenes corporales del mineral. Además, el consumo de carne roja, pero no el de carne blanca ni el de productos cárnicos, se asocia con un mejor estado de hierro. Tras la intervención nutricional se concluye que la ingesta de un zumo de frutas fortificado con pirofosfato férrico microencapsulado en liposomas como parte de la dieta habitual, que aporta 18 mg de hierro al día (100% de la RDA), mejora claramente el estado de hierro en mujeres con deficiencia del mineral, valorado por cambios muy significativos en todos los biomarcadores analizados. Aunque se encuentra una elevada prevalencia de deficiencia de vitamina D en estas mujeres con deficiencia de hierro, existiendo una asociación entre los valores de 25-hidroxivitamina D y la saturación de la transferrina, la recuperación del estado de hierro por el consumo del zumo fortificado no afecta a los niveles de 25-hidroxivitamina D ni al remodelado óseo. No obstante, el aumento del transporte de hierro a tejidos es menor en las mujeres que presentan también deficiencia de esta vitamina. Tampoco se encontró una interacción dieta-gen al valorar la respuesta a la ingesta del zumo fortificado en función de la presencia o no del alelo menor del SNP rs3811647, ya que todas las mujeres mejoran su estado de hierro independientemente de su genotipo. En cuanto a los factores fisiológicos, se observa que el uso de anticonceptivos hormonales implica menores pérdidas menstruales y un mejor estado de hierro en mujeres con deficiencia de hierro. Sin embargo, también se asocia con valores de transferrina sérica más elevados, lo que en lugar de relacionarse con su estado de hierro parece deberse al tratamiento hormonal. Finalmente, el estudio conjunto de los factores dietéticos, genéticos y fisiológicos involucrados en el estado de hierro, revela que la ingesta de hierro hemo, el SNP rs3811647 y el uso de anticonceptivos hormonales explican el 38.6% de la variabilidad de la transferrina sérica en mujeres con predisposición a anemia ferropénica.

Iron deficiency is the most prevalent nutritional problem worldwide, both developed and developing countries, and is the main cause of anemia. This Thesis focuses on the study of dietary, genetic and physiological risk factors for iron deficiency anemia, and assesses the efficacy of a functional food in iron deficient women.

A study of association between genetic variants and parameters of iron metabolism was carried out in 270 Caucasian women of childbearing age, and subsequently we conducted a study of expression of the most relevant genetic variant. We also assessed the habitual food, energy and nutrient intakes in a group of these women and we estimated their menstrual losses, relating all the above with their iron status. In addition, we studied the effect of the consumption, as part of the usual diet, of an iron-fortified juice compared with a placebo juice on iron metabolism and bone remodelling in a group of 122 women at risk of anemia deficiency, and the possible diet-gene interaction. Finally, we investigated the overall influence of key dietary, genetic and physiological factors on iron biomarkers in this population group.

The obtained results show that four SNPs, two in the transferrin gene (rs3811647, rs1799852) and two in the HFE gene (C282Y, H63D), explain 35% of the genetic variation or heritability of serum transferrin in menstruating women. Carriers of the minor allele of rs3811647 present higher serum transferrin levels and lower transferrin saturation, which may indicate higher iron deficiency anaemia risk, although the simultaneous presence of the other SNPs appear to have compensatory effects. The study of expression reveals that the mutated allele of the intronic SNP rs3811647 enhances the expression of the transferrin gene, which might explain the high serum transferrin levels observed in carriers of this mutation. The study of the dietary factors shows that total iron intake is not related with any iron status biomarkers in menstruating women; however, haem-iron intake, highly bioavailable, is the main dietary factor contributing to iron stores. Moreover, consumption of red meat but not white or processed meat is associated with increased iron status. The nutritional intervention reveals that consumption, as part of the habitual diet, of an iron-fortified fruit juice with microencapsulated iron pyrophosphate which provides 18 mg of iron per day (100% of the RDA), clearly improves iron status in iron deficient women, as determined by highly

significant changes in all of the analysed iron biomarkers. Although we found a high prevalence of vitamin D deficiency in those iron-deficient women, and there is an association between 25-hydroxyvitamin D (marker of vitamin D status) and transferrin saturation, the recovery of iron status by consumption of the iron-fortified food does not affect 25-hydroxyvitamin D levels or bone remodelling. Nevertheless, the increase in iron supply to tissues is lower if the women also present vitamin D deficiency. When the response to the intake of the iron-fortified juice it is assessed taking into account SNP rs3811647 no diet-gene interaction is found, since all the women improve their iron status regardless of their genotype. With respect to physiological factors, it is observed that the use of hormonal contraceptive means less menstrual blood loss and improved iron status in women with iron deficiency. Nevertheless, hormonal contraceptive use is also associated with higher serum transferrin levels, which instead of being related to iron status appears to be due to the hormonal treatment. Finally, the overall study of dietary, genetic, and physiological factors involved in iron status, reveals that haem-iron intake, SNP rs3811647 and the use of hormonal contraceptives, explain 38.6% of the variability of serum transferrin in women at risk of iron deficiency anemia.

INTERÉS Y OBJETIVOS

El hierro es un mineral esencial para el ser humano. Participa en numerosos procesos biológicos indispensables para la vida pero su exceso es tóxico para el organismo, por lo que requiere de un sofisticado sistema de regulación para cubrir las demandas evitando a su vez una acumulación excesiva.

Cuando el aporte de este mineral es insuficiente para cubrir los requerimientos se produce una deficiencia de hierro, condición en la que los almacenes movilizables de hierro en el organismo disminuyen y el aporte del nutriente a los tejidos se ve disminuido. Si el balance negativo persiste, puede dar lugar a una situación de anemia ferropénica, en la que no existe una cantidad suficiente de glóbulos rojos en sangre, viéndose comprometido el transporte de oxígeno a las células (WHO, 2008).

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, y es la principal causa de anemia. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), se estima que cerca de 1.000 millones de personas en el mundo padecen anemia ferropénica, y aproximadamente el doble sufren deficiencia de hierro, lo que afecta a su salud y su calidad de vida (WHO, 2007). Esta falta de hierro se ha relacionado con una reducción en la capacidad física y cognitiva, lo que origina un peor rendimiento laboral, y también con una menor resistencia a infecciones. Además, estudios recientes han asociado la presencia de anemia ferropénica con determinadas enfermedades, como la insuficiencia cardíaca o la osteoporosis (Pasricha et al., 2010).

La anemia ferropénica es multifactorial y en su desarrollo intervienen la alimentación, la situación fisiológica y la carga genética del individuo.

Respecto al papel de la alimentación, hay que tener en cuenta tanto la cantidad como la biodisponibilidad del hierro de la dieta. Por un lado, la ingesta dietética de hierro debe ser la adecuada para mantener la homeostasis del micronutriente, teniendo en cuenta edad, situación fisiológica y género (Moreiras et al., 2011). Por otro lado, el hierro es un mineral cuya biodisponibilidad depende de múltiples factores, tanto los dietéticos como los propios del individuo. Es bien sabido que la biodisponibilidad del hierro no hemo, la mayor fuente de hierro de la dieta (85-90%), se ve afectada por la presencia de diferentes componentes presentes en la misma; mientras que la

del hierro hemo, que se encuentra sólo en alimentos de origen animal (10-15%), no se modifica tan fácilmente y la absorción se realiza de manera más eficaz. La presencia otros componentes de la dieta, como el ácido ascórbico y el tejido animal aumenta la absorción de hierro no hemo. Por el contrario, el ácido fítico y los polifenoles son los principales inhibidores de su absorción, mientras que el calcio ha sido el único nutriente que ha sido descrito como inhibidor tanto de hierro no hemo como de hierro hemo (Hurrell y Egli, 2010). En relación a los factores individuales, se ha observado que las personas con mejor estado de hierro absorben proporcionalmente una menor cantidad del hierro ingerido que aquellos que presentan un peor estado de hierro, en los que la absorción se ve favorecida (Moretti et al., 2006).

Además, la situación fisiológica del individuo puede dar lugar a un incremento de las necesidades o a un aumento de las pérdidas de hierro. Es por ello que determinados grupos de población, como los niños, las embarazadas y las mujeres en edad fértil, tienen un mayor riesgo de desarrollar anemia ferropénica. Este último colectivo tiene una elevada prevalencia de deficiencia de hierro y anemia ferropénica por las pérdidas de hierro que causa la menstruación. En Europa, hay datos que afirman que entre el 10-30% de las mujeres menstruantes presenta deficiencia de hierro y entre el 1.5 y el 14% anemia ferropénica (Hercberg et al., 2001), mientras que en Estados Unidos el porcentaje de deficiencia de hierro se encuentra en el 9.2% (Cogswell et al., 2009). En los países en vías de desarrollo, las cifras de mujeres anémicas doblan estos valores (Berger et al., 2011).

Dilucidar la influencia de la variabilidad genética en la salud humana y en la enfermedad es uno de los mayores retos científicos del siglo XXI. En el caso del metabolismo del hierro, recientemente se han desarrollado diversos estudios de asociación genética (GWAs) que relacionan variantes de genes implicados en el metabolismo del hierro, como el gen de la transferrina (*Tf*), el de la hemocromatosis (*HFE*), el de la matriptasa (*TMPRSS6*) y el del receptor de transferrina (*TfR2*), con rasgos hematológicos clínicamente relevantes como los niveles de hemoglobina, volumen corpuscular medio, ferritina sérica, transferrina y saturación de la transferrina (Soranzo et al., 2009; Ganesh et al., 2009; Chambers et al., 2009; Benyamin et al., 2009a; McLaren et al., 2011). Todos estos estudios revelan variantes genéticas que podrían

predisponer a determinados individuos a desarrollar una deficiencia del mineral o una anemia ferropénica.

Por todo ello, la prevención tanto de la deficiencia de hierro y como de la anemia ferropénica es desde hace más de una década una prioridad de la OMS, y las estrategias deben aplicarse a los diferentes grupos de riesgo (WHO, 2001). Entre estas se incluye la modificación de los hábitos alimentarios, la suplementación con hierro o la inclusión de alimentos fortificados. La modificación de la dieta sería el método preferente, aunque es difícil cambiar los hábitos dietéticos y los alimentos que contienen hierro más biodisponible, como por ejemplo la carne roja, son también más caros y su consumo excesivo se ha asociado con el desarrollo de determinadas enfermedades. La suplementación es eficaz, pero su mayor limitación es la falta de cumplimiento debido a las molestias gastrointestinales que suelen causar los suplementos. Finalmente, la opción de utilizar alimentos fortificados con hierro es considerada como la medida más práctica y eficaz para la prevención y la erradicación de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica (Lynch, 2005). Sin embargo, la adición de hierro a los alimentos es uno de los procesos que sigue constituyendo un reto para la industria alimentaria, ya que la elección del tipo y la cantidad de la sal fortificante y del alimento matriz es fundamental para evitar problemas tanto en la aceptación y vida media del producto como en la eficacia del alimento para la mejora del estado de hierro (Mehansho, 2006).

La fortificación de alimentos básicos de amplio consumo, como la harina y la leche, ha sido obligatoria en algunos de los países desarrollados en los últimos 50 años del siglo XX, y es ampliamente utilizada en países en vías de desarrollo. Sin embargo, el impacto sobre el estado de hierro de la población ha sido mínimo. Un estudio reciente ha observado que tan sólo en 9 países de los 78 en los que se fortifica la harina con hierro de forma obligatoria se ha encontrado una mejora en el estado de hierro de la población, probablemente por la baja biodisponibilidad de los compuestos y por las matrices utilizadas (Hurrell et al., 2010). Todo ello ha puesto de manifiesto la necesidad de mejora de los programas de fortificación, y se espera que los mayores avances se obtengan en la próxima década. Se están llevando a cabo enfoques más innovadores para superar las dificultades tecnológicas de la fortificación con

hierro, como el encapsulado de diferentes sales para mejorar su solubilidad y evitar los cambios organolépticos en el producto. Otra opción que se plantea es la utilización de matrices que contengan componentes que favorezcan la absorción de hierro, por ejemplo el ácido ascórbico (Lynch y Stoltzfus, 2003). Por otro lado, en los países desarrollados donde conviven grupos con riesgo de desarrollar anemia ferropénica junto con otros grupos propensos a desarrollar sobrecarga de hierro, la fortificación dirigida a determinados consumidores se hace imprescindible para evitar problemas de salud pública.

A todo ello hay que añadir el desarrollo de nuevos campos de investigación como la nutrigenética, que estudia la distinta respuesta fenotípica a la dieta en función del genotipo de cada individuo (Ordovás y Corella, 2008). Esta disciplina abre una nueva perspectiva en la prevención nutricional de la deficiencia de hierro y la nutrición personalizada. El hecho de que se hayan identificado determinadas variantes genéticas relacionadas con diversos marcadores del estado de hierro nos lleva a pensar que podría existir una interacción dieta-gen, lo que podría originar diferentes respuestas de los individuos a un alimento fortificado con hierro en función de su genotipo específico.

Teniendo en cuenta todas estas premisas, para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se plantean los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Identificar los posibles factores de riesgo genético asociados a la deficiencia de hierro y a la anemia ferropénica mediante estudios de asociación y de expresión de las variantes genéticas.
2. Conocer la influencia de la ingesta de energía, alimentos y nutrientes sobre el estado de hierro en un grupo de mujeres en edad fértil.
3. Valorar la eficacia, como parte de la dieta habitual, del consumo de un alimento funcional (zumو fortificado con hierro) frente a un alimento placebo (zumو sin fortificar) sobre el metabolismo de hierro en mujeres con deficiencia de hierro.
4. Determinar si la ingesta del zumo funcional fortificado con hierro respecto al placebo origina cambios en el metabolismo óseo, particularmente si la recuperación del estado nutricional del hierro se acompaña de variaciones en el estado de la vitamina D y en el remodelado óseo.
5. Conocer la posible interacción dieta-gen: valorar si la presencia de alguna mutación genética asociada con deficiencia de hierro cambia la respuesta a la ingesta del alimento funcional fortificado con hierro.
6. Valorar la influencia de determinados factores fisiológicos (pérdidas menstruales) y del uso de anticonceptivos hormonales sobre el estado de hierro en mujeres con deficiencia de hierro.
7. Determinar la influencia conjunta de factores clave de tipo dietético, genético y fisiológico sobre los parámetros del metabolismo del hierro en mujeres con predisposición a anemia.

INTRODUCCIÓN

1 Funciones y distribución del hierro en el organismo

El hierro, uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre, es un elemento traza esencial para el ser humano, ya que participa en numerosos procesos biológicos indispensables para la vida. Sin embargo, es también un potente tóxico para las células; por ello requiere de un sofisticado complejo de regulación que sirva para cubrir las demandas de las células, y al mismo tiempo evitar su excesiva acumulación (Pietrangelo, 2002).

La importancia biológica del hierro se debe a su capacidad para aceptar y donar electrones fácilmente, intercambiándose entre su forma férrica (Fe^{3+}) y ferrosa (Fe^{2+}), lo que le permite participar en reacciones de oxidación-reducción conocidas como reacción de *Fenton* (Wessling-Resnick, 1999). Estas reacciones redox son esenciales para asegurar las funciones biológicas del hierro, pero también son las que le proporcionan características tóxicas cuando se encuentra en exceso, ya que el hierro libre puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañarían componentes biológicos esenciales como los lípidos, las proteínas y el ADN (McCord, 1998).

1.1 Funciones del hierro

Un adulto promedio sano contiene un total de 3-4 g de hierro corporal (40-50 mg de hierro por Kg de peso), de los cuales el 75%, considerado hierro funcional, está destinado a cubrir funciones metabólicas y el 25% restante, unos 5-10 mg/kg de peso, se encuentra almacenado como hierro de reserva (Lynch, 1998).

La función metabólica esencial del hierro es la del transporte de oxígeno, ya que la mayor parte del hierro funcional, el 65%, se encuentra formando parte de la hemoglobina. Ésta es una proteína constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales está unida a un grupo prostético hemo, característica que la define como un transportador eficiente de O_2 , CO_2 y H^+ (Huisman y Schroeder, 1970). La segunda proteína con mayor contenido de hierro hemo (4%) es la mioglobina, encargada del transporte y almacenamiento de O_2 en el músculo (Gunsalus et al., 1977). Otras proteínas que contienen hierro hemínico son los citocromos mitocondriales, los cuales

participan activamente en el transporte de electrones en la mitocondria; y las enzimas catalasa y peroxidasa, que protegen a la célula evitando el estrés oxidativo (Boldt, 1999).

El hierro no hemo o inorgánico, como metal divalente o trivalente, forma parte de la NADH-citocromo C reductasa, la succinil deshidrogenasa, y la xantin oxidasa; las dos primeras participan en la respiración celular y la segunda en los mecanismos que activan la inmunidad (Wickramasinghe et al., 1974). También forma parte de la subunidad R2 de la ribonucleótido reductasa, enzima necesaria para la síntesis de ADN (Elledge et al., 1992).

Todas estas enzimas son críticas en muchos procesos celulares básicos, como la síntesis de ADN, ARN y proteínas, el transporte de electrones, la respiración celular, la diferenciación y proliferación celular, y la regulación de la expresión de los genes, lo que explica la importancia de su presencia en cantidad suficiente en el organismo.

Además, el papel del hierro en el sistema nervioso es muy importante. Este mineral parece intervenir en la síntesis, degradación y almacenamiento de neurotransmisores como serotonina, dopamina y ácido gammaaminobutírico (GABA). La distribución del GABA y la dopamina coincide aproximadamente con la de este metal, y se ha sugerido que podría existir alguna participación del hierro en las funciones dopaminérgicas y gabaminérgicas (Suárez et al., 1985). Además, el hierro es imprescindible para la mielinización. El oligodendrito, responsable de la producción de mielina, es el tipo de célula que predominantemente contiene hierro en el cerebro (Morris et al., 1992).

1.2 Distribución del hierro

En condiciones normales, aproximadamente entre 1-2 mg/día del hierro dietético es absorbido en el duodeno y liberado a la circulación, donde es transportado por la proteína sérica transferrina, que puede ligar hasta 2 átomos de hierro (Figura 1). En sangre circulan aproximadamente 3 mg de hierro unido a la transferrina, el cual es captado por las células a través del receptor de transferrina 1 (TfR1). Una parte del hierro (300 mg) es destinado a la médula ósea para la generación de eritrocitos y producción de

hemoglobina. De hecho, la mayor parte de hierro del organismo, unos 1800 mg, está formando parte de los glóbulos rojos circulantes. Cuando los eritrocitos llegan a la senescencia (tienen una vida media de 120 días) o están dañados, son fagocitados por los macrófagos del retículo endotelial, donde el hierro que formaba parte de la hemoglobina queda almacenado o se vuelve a poner en circulación unido a la transferrina, según las necesidades del organismo, lo que se denomina reciclado de hierro. El resto del hierro (300 mg) va a otros tejidos, por ejemplo el músculo, ya que forma parte de la mioglobina, o es almacenado en forma de ferritina, principalmente en el hígado (1000 mg), donde puede ser recirculado en caso de necesidad. Las pérdidas de hierro, 1-2 mg/día, se deben fundamentalmente a la descamación intestinal y a pérdidas de sangre que pueden ser fisiológicas (en el caso de las mujeres, las pérdidas menstruales) o patológicas (Anderson et al., 2007).

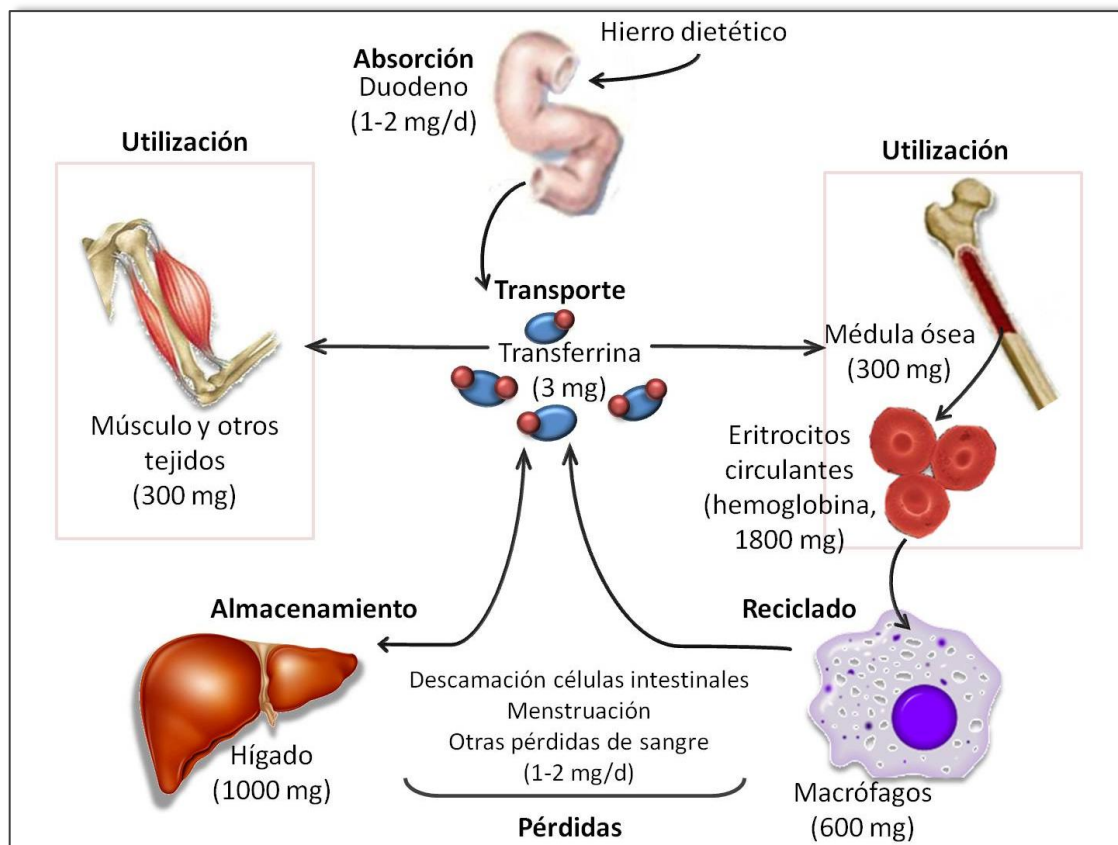


Figura 1. Distribución del hierro en el organismo de un adulto sano (Modificado de Andrews, 1999)

2 Metabolismo del hierro

El intercambio de hierro entre los diferentes compartimentos del organismo es un proceso modulado según las demandas fisiológicas. El metabolismo del hierro incluye: la absorción del mineral a nivel intestinal, el transporte y la captación de hierro a nivel celular, su utilización en los tejidos, el reciclado de hierro por los macrófagos y su almacenamiento en hígado. Aunque, como se ha señalado anteriormente, se producen diariamente pérdidas de hierro, éstas no están implicadas en la regulación del mineral, ya que los humanos no tienen la capacidad de excretar hierro una vez absorbido (Ganz, 2008).

2.1 Absorción de hierro

El hierro ingerido con los alimentos se absorbe casi exclusivamente en la zona proximal del duodeno (Figura 2). En este punto hay que diferenciar dos vías de absorción en función de la forma en la que este hierro se encuentre (Hurrell y Egli, 2010):

- Hierro no hemo o inorgánico: se encuentra tanto en alimentos de origen animal como de origen vegetal, en la forma reducida (Fe^{2+}) o en la forma oxidada (Fe^{3+}). Constituye la mayor fuente de hierro en la dieta habitual de los países occidentales (85-90%), y su absorción presenta una enorme variabilidad, debido a que existen numerosos factores que la condicionan.
- Hierro hemo: consiste en una molécula de protoporfirina que contiene un átomo de hierro en forma reducida en su interior. Está presente solamente en alimentos de origen animal (carnes y pescados) y supone aproximadamente el 10% del hierro total de la dieta, aunque su absorción es mucho más eficiente que la de hierro no hemo.

2.1.1 Absorción de hierro no hemo o inorgánico

Los complejos de hierro no hemo presentes en los alimentos son degradados durante la digestión en el tracto gastrointestinal, debido a la acción de la pepsina y del ácido clorhídrico. Una vez liberado, la mayor parte del hierro no hemo pasa a formar parte de un *pool* de hierro ionizado en el que predomina el hierro férrico (Fe^{3+}), el cual tiene una baja biodisponibilidad y prácticamente no se absorbe (Han, 2011). Por tanto, el Fe^{3+} debe ser reducido a su forma ferrosa (Fe^{2+}) para que se produzca su absorción, y ello requiere dos condiciones: la presencia de un medio ácido, como el del estómago, y de un compuesto con actividad ferroreductasa (Sharp y Srai, 2007). Aunque existen determinados componentes de la dieta que pueden realizar esta función, la principal actividad de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} es llevada a cabo por el enzima Dcytb (*duodenal cytochrome B*) (Figura 2-1), el cual es una hemoproteína situada en la membrana apical del enterocito que utiliza ascorbato para facilitar la ferroreducción (Oakhill et al., 2008). Su expresión se ve aumentada en situaciones de deficiencia de hierro e hipoxia, y se ha demostrado que la sobreexpresión del enzima en células intestinales humanas Caco2 implica un aumento significativo de la absorción de hierro (McKie et al., 2001; Latunde-Dada et al., 2008).

El Fe^{2+} es entonces transportado a través de la membrana del enterocito por el transportador de metales divalentes DMT-1 (*divalent metal transporter 1*) (Figura 2-1). El DMT-1 es capaz de transportar protones con una estequiometría de un protón por cada catión divalente, y este gradiente de protones, asociado con el pH ligeramente ácido del duodeno proximal, es la fuerza motriz para la entrada del Fe^{2+} al enterocito. Es decir, el transporte de hierro a través del DMT-1 está acoplado a una bomba de protones y es dependiente de pH, siendo óptimo un $\text{pH} < 6$ (Tandy et al., 2000). El DMT-1 es capaz de transportar no solamente el Fe^{2+} , sino también un amplio rango de cationes divalentes: Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , y Pb^{2+} (Mackenzie et al., 2008).

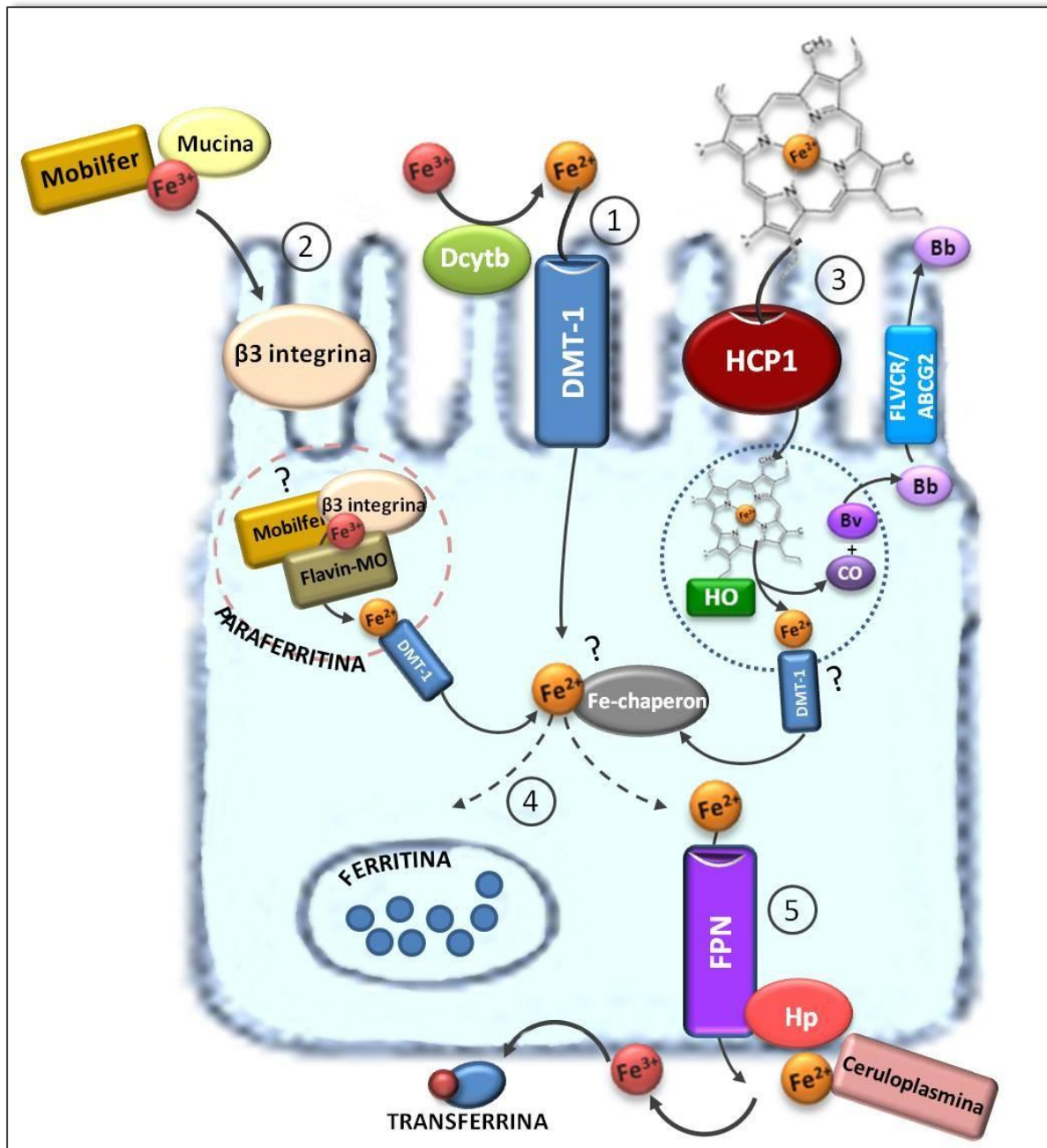


Figura 2. Absorción de hierro hemo y no hemo en el enterocito. 1) Absorción de hierro ferroso (Fe^{2+}), 2) absorción de hierro férrico (Fe^{3+}), 3) absorción de hierro hemo, 4) transporte y almacenamiento de hierro intracelular, 5) transferencia de hierro a la circulación. Mobilferrina (mobilfer), flavin mono-oxigenasa (flavin-MO), transportador divalente de metales (DMT-1), *duodenal cytochrome B* (Dcytb), *heme carrier protein* (HCP-1), hemo-oxigenasa (HO), monóxido de carbono (CO), biliverdina IX- α (Bv), bilirrubina IX- α (Bb), proteínas de flujo FLVCR y ABCG2 (FLVCR/ABCG2), ferroportina (FPN) y hepastina (Hp).

Se ha identificado que existen al menos cuatro isoformas funcionales del DMT-1 en las células del epitelio intestinal, las cuales son consecuencia de un empalme o *splicing* alternativo producido en el exón 16 que codifica la proteína y de la presencia de dos sitios de comienzo de transcripción, denominados exón 1A y 1B (Lee et al., 1998; Hubert y Hentze, 2002). El *splicing* del exón 16 puede dar lugar a dos variantes que difieren en sus amino terminales (19-25) y en su secuencia 3'UTR (*untranslated sequence*), lo que lleva a que cada una de las dos variantes contenga un elemento sensible de hierro, IRE (*iron responsive element*) en su secuencia 3'UTR (Lee et al., 1998). Por tanto, hay cuatro isoformas diferentes de DMT-1 que pueden codificar cuatro proteínas diferentes, DMT-1A, DMT-1A-IRE, DMT-1B, DMT-1B-IRE. Aunque estas cuatro variantes han sido detectadas en niveles variables en las células del epitelio intestinal, la que contiene el exón 1A-IRE ha sido propuesta como la más implicada en la absorción, ya que es la que se encuentra fundamentalmente en la membrana apical de los enterocitos (Hubert y Hentze, 2002).

Se ha descrito otro transporte alternativo de hierro no hemo, que implicaría el paso de Fe^{3+} a través del complejo β_3 integrina-mobilferrina al enterocito (Figura 2-2). Sin embargo esta vía de absorción no está bien caracterizada y hay pocas evidencias que defiendan su existencia, por lo revisiones recientes sobre el tema consideran que el transporte de Fe^{3+} es minoritario (Bleackley et al., 2009). Se cree que en estados de deficiencia de hierro la mobilferrina podría ser secretada en el lumen del intestino delgado junto con la proteína de la mucosa intestinal, mucina, y el complejo formado por las dos proteínas podría quelar Fe^{3+} (Conrad et al., 1994). El complejo soluble mobilferrina-mucina- Fe^{3+} llegaría hasta la membrana apical del enterocito donde la β_3 integrina facilitaría el paso del Fe^{3+} al interior del enterocito (Simovich et al., 2003). Dentro del citosol, se produciría la formación de la paraferitina, un complejo formado por β_3 integrina, mobilferrina, flavin mono-oxigenasa y DMT-1, con actividad feroreductasa capaz de reducir el Fe^{3+} transportado a Fe^{2+} (Umbreit et al., 1996).

2.1.2 Absorción de hierro hemo

Antes de que el hierro hemo pueda ser utilizado, debe ser liberado de las partículas de hemoglobina y mioglobina presentes en los alimentos por la actividad proteolítica de enzimas en el lumen del estómago y en la primera porción del intestino delgado. Parece que la molécula que conforma el hierro hemo (protoporfirina+Fe²⁺) se absorbe intacta, aunque el proceso por el cual se produce el paso a través de la membrana apical del enterocito aún no está bien caracterizado. A la hipótesis más antigua de que el hierro hemo podría ser captado por un receptor mediante endocitosis, se han sumado trabajos más recientes que sugieren la presencia de un transportador específico de hemo (West y Oates, 2008). Así, se han identificado diferentes proteínas ligadoras de hierro hemo, aunque sólo una con actividad transportadora, denominada HCP-1 (*heme carrier protein*) (Figura 2-3). Aunque la elevada expresión de este transportador en células epiteliales de duodeno sugiere que la HCP-1 podría ser la proteína que participaría en la captación del hierro hemo de la dieta, datos recientes sugieren que también podría estar implicada en el transporte de folato, de manera independiente al transporte de hemo (Shayeghi et al., 2005; Qiu et al., 2006). Por tanto, se requieren más estudios para conocer de forma más precisa su función en el metabolismo del hierro.

Una vez en el citosol, la molécula de hemo permanece en vesículas unidas a la membrana. Dentro de las vesículas, el hemo es degradado por el enzima hemo-oxigenasa (HO), el cual libera el hierro ferroso del anillo de protoporfirina, dando lugar a CO y biliverdina IX- α , la cual es rápidamente reducida a bilirrubina IX- α y eliminada de la célula a través de las proteínas de flujo ABCG2 y FLVCR (Tenhunen et al., 1972; Sharp y Srai, 2008). Un tema aún desconocido es cómo el Fe²⁺ liberado se incorporaría al citoplasma del enterocito. Estudios recientes han sugerido que el DMT-1 podría estar implicado transportando el Fe²⁺ de la vesícula al citosol (West y Oates, 2008). Sin embargo, está bastante establecido que la digestión de la molécula de hemo se realiza en su totalidad en el interior del enterocito, ya que no se ha detectado un flujo de salida de la molécula de hemo intacta por la membrana basolateral (Worthington et al., 2001; Ma et al., 2010; Uc et al., 2010).

2.1.3 Transporte y almacenamiento de hierro intracelular

El hierro absorbido puede tener dos destinos en función de los requerimientos del organismo. Si las necesidades de hierro están cubiertas y los almacenes repletos, una elevada cantidad del hierro absorbido será almacenado en el interior del enterocito en forma de ferritina. Debido a que los enterocitos del duodeno tienen una vida media de 3-4 días, la mayor parte de la ferritina contenida en su interior se perderá por la descamación celular. Por otro lado, si las necesidades de hierro del cuerpo son elevadas, la mayor parte del hierro absorbido pasará a la circulación a través de la membrana basolateral del enterocito (Sharp y Srai, 2008).

El mecanismo de transporte del hierro en el citoplasma es desconocido. La hipótesis de que éste fuera llevado a cabo por una familia de proteínas que parece estar implicada en el transporte de metales en el citoplasma (metalchaperones) (Figura 2-4), como en el caso del cobre, se ha confirmado recientemente por la identificación de dos Fe-chaperones, uno implicado en el transporte intracelular de hierro a la ferritina (PCBP1) y otro a la mitocondria (frataxina) (Subramanian et al., 2011).

2.1.4 Transferencia de hierro a la circulación

La transferencia del hierro absorbido a la circulación a través de la membrana basolateral del enterocito tiene lugar por la acción coordinada de la proteína exportadora ferroportina (FPN) y de la ferroxidasa hepastina (Figura 2-5), la cual parece tener un papel en la estabilidad del complejo de la FPN en la superficie de la membrana (Bleackley et al., 2009). El flujo de salida del hierro también depende de la ceruloplasmina, una ferroxidasa plasmática dependiente de cobre, que facilitaría la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , necesaria para su incorporación a la proteína transportadora de hierro en sangre, la transferrina (McKie et al., 2000).

Se ha demostrado que la FPN es crucial en el flujo de salida de hierro de la membrana basolateral, y por tanto, en el metabolismo del hierro. Un estudio en ratones en los que se había inactivado la FPN mostró que estos animales tenían una absorción normal, pero la subsecuente liberación de hierro a la circulación no se llevaba a cabo, produciéndose el desarrollo de una anemia ferropénica severa (Donovan et al., 2005). Recientemente, se ha descrito que

existen dos isoformas de ARN mensajero de la FPN (FPN-A y FPN-B), que implicaría cambios en su regulación, ya que la FPN-A contiene un IRE en su secuencia 5'UTR (Zhang et al., 2009).

2.1.5 Regulación de la absorción de hierro

La regulación de la absorción intestinal de hierro es compleja y depende fundamentalmente de dos factores: la cantidad y naturaleza del hierro de los alimentos, además de los otros componentes de la dieta; y el estado de hierro del individuo. Así, individuos con mejor estado de hierro absorberán proporcionalmente menos cantidad del hierro ingerido que aquellos que presenten un peor estado de hierro, en cuyo caso la absorción se verá favorecida. Recientemente se ha indicado que este proceso tiene lugar a través de la modulación de la expresión por múltiples vías de diversas proteínas implicadas en la absorción como el DMT-1, el Dcytb o la FPN (Han, 2011).

2.1.5.1 Regulación vía proteínas reguladoras de hierro (IRP)

La idea de que la absorción de hierro a nivel del duodeno tiene un mecanismo de regulación local surgió de la observación en animales de experimentación de que la administración de una gran dosis de hierro oral disminuía la absorción de otra dosis de hierro dada unas horas más tarde. Este fenómeno se denominó bloqueo de la mucosa. Debido al corto intervalo de tiempo entre dosis, el bloqueo de la mucosa actuaba regulando la absorción a nivel local, reduciéndola por la inhibición de las proteínas implicadas en el transporte de hierro (Frazer et al., 2003). Se ha sugerido que el bloqueo de la mucosa depende del control post-transcripcional de genes implicados en el metabolismo de hierro, el cual está bien determinado. Las proteínas reguladoras de hierro, IRPs (*iron regulatory proteins*) se unen a los elementos sensibles de hierro, IREs (*iron responsive elements*) presentes en el ARN mensajero (ARNm) de las proteínas implicadas en la absorción de hierro cuando los niveles de hierro decrecen. La unión de las IRPs con los IREs puede suponer un incremento de la estabilidad del ARNm (como por ejemplo en el DMT-1) o un bloqueo de la traslación (por ejemplo en la ferritina o la FPN) (Muckenthaler et al., 2008). En un estudio en ratones *knockout* a los que se

inhibió la expresión de IRPs en el intestino, se observó baja presencia de DMT-1 y alta de FPN, produciéndose malnutrición y muerte de los animales, con lo que se corrobora el rol crítico que ejercen las IRPs en el control de la expresión de DMT-1 y FPN (Galy et al., 2008). Sin embargo, debido a que no todas las isoformas de estas proteínas contienen IREs y a que el hierro regula el ARNm del Dcytb pero no tiene IRE, la regulación a nivel local de la absorción no puede atribuirse únicamente al sistema de control post-transcripcional IRP-IRE.

2.1.5.2 Regulación mediante el factor inducible de hipoxia (HIF)

Estudios recientes han sugerido que el factor inducible de hipoxia, HIF (*hipoxia-inducible factor*) juega un importante papel en la regulación de la absorción de hierro. El HIF es un factor de transcripción que contiene dos subunidades, HIF α y HIF β , cuyos niveles se regulan por degradación de la proteína. En situaciones normales, la subunidad HIF α es hidroxilada por una prolil-hidroxilasa dependiente de hierro, con lo que el factor de transcripción deja de ser funcional, mientras que en situaciones de hipoxia la HIF α permanece estable (Ivan et al., 2001). Es entonces cuando el heterodímero HIF se une a los elementos sensibles de hipoxia, HREs (*hipoxia-responsive elements*) presentes en la secuencias diana de los genes reguladores de proteínas implicadas en la absorción, como la ceruloplasmina y la HO (Peyssonnaud et al., 2008). También se ha sugerido que los genes del DMT-1 y del Dcytb podrían tener HRE en sus regiones promotoras (Mastrogiannaki et al., 2009; Shah et al., 2009).

2.2 Transporte de hierro y captación a nivel celular

La mayor parte del hierro circula en sangre unido a la glicoproteína transferrina, para su distribución a los tejidos. La proteína de 80 kDa de peso molecular está formada por una cadena polipeptídica de 679 aminoácidos organizados en dos lóbulos homogéneos conocidos como lóbulo N y lóbulo C, cada uno de los cuales contiene un lugar para la fijación del hierro (Hiroshi, 2000). Cada molécula de transferrina es capaz de ligar dos átomos de hierro férrico (Fe^{3+}) con una afinidad que depende del pH. La máxima afinidad se obtiene a nivel extracelular (pH 7.4) y disminuye cuando el pH es inferior a

6.5, para permitir la liberación del Fe^{3+} y su captación por parte de las células (Aisen et al., 1978).

La transferrina existe como apotransferrina (apo-Tf) (proteína sin hierro), transferrina monoférrica (unida a una molécula de hierro), y transferrina diférrica u holo-transferrina (holo-Tf) (con dos moléculas de hierro). La presencia de cada una de las formas depende de la concentración de hierro y del número de moléculas de transferrina. En condiciones normales, aproximadamente un 30% de la transferrina tiene los sitios de unión de hierro saturados (Hentze et al., 2010).

La síntesis de transferrina se lleva a cabo predominantemente en el hígado, aunque se ha visto que otros tejidos, como el cerebro y los testículos, son capaces de sintetizarla en menores cantidades (Zakin, 1992). La regulación de la síntesis de esta proteína depende de varios factores. En un estado de deficiencia de hierro, la síntesis de transferrina en hígado aumenta significativamente (de 2 a 4 veces), no viéndose afectada en otros tejidos (Idzerda et al., 1986). Estímulos inflamatorios o inmunológicos podrían disminuir la transferrina circulante, mientras que situaciones de hipoxia la aumentarían (Djeha et al., 1995; Rolfs et al., 1997).

La captación celular del hierro de la transferrina se produce fundamentalmente a través del receptor de transferrina 1 (TfR1), presente en la membrana celular de multitud de tipos de células que necesitan altas cantidades de hierro para desarrollar sus funciones, como las células eritroides, las células de la placenta o las células endoteliales de los capilares del sistema nervioso (Ponka y Lok, 1999). El TfR1 es una glicoproteína de membrana que puede captar dos moléculas de transferrina. La saturación de la transferrina afecta su afinidad por el receptor, de tal manera que la holo-transferrina tiene 30 y 500 veces más afinidad por el TfR1 que la transferrina monoférrica o la apo-transferrina, respectivamente (Young et al., 1984).

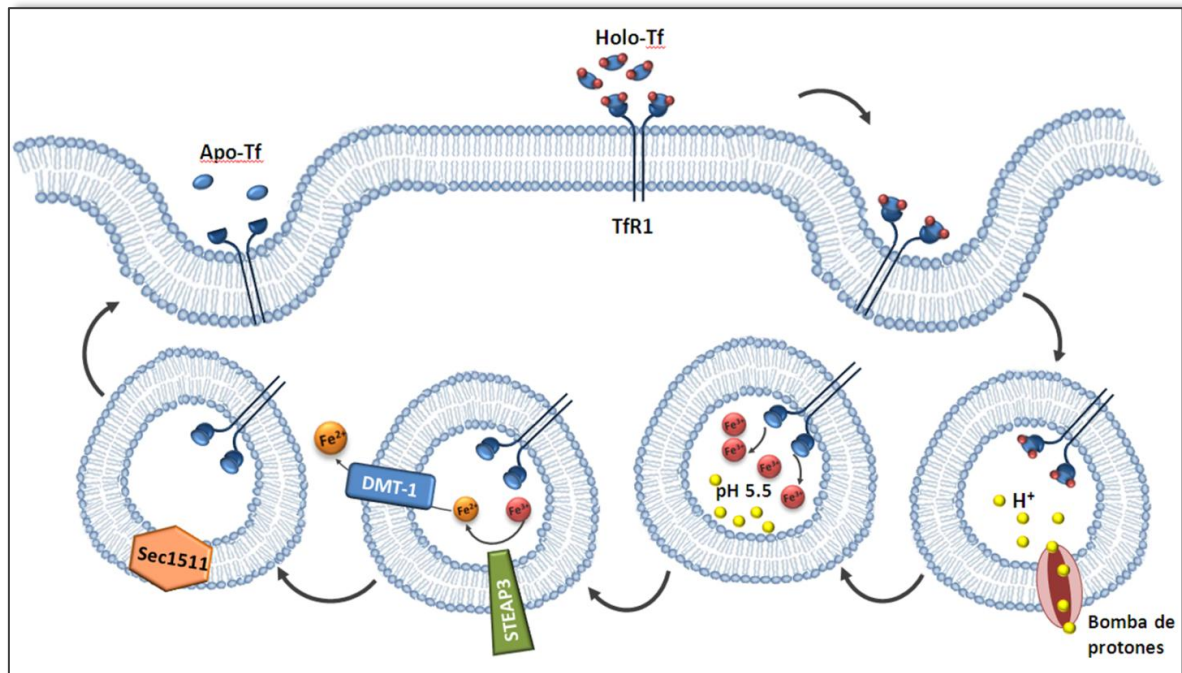


Figura 3. Ciclo de la captación de la holo-transferrina (Holo-Tf) a través del receptor de transferrina (TfR1). Apotransferrina (Apo-Tf) (Modificado de Gkouvatsos et al., 2011).

El complejo holo-Tf/TfR1 es introducido en la célula por endocitosis, a través de las depresiones de la membrana celular (Figura 3). La acidificación del endosoma por una bomba de protones ATPasa a pH 5.5 permite la liberación del Fe^{3+} contenido en la transferrina, el cual es reducido por la reductasa férrica STEAP3 para su posterior transporte al citosol a través del DMT-1. El ahora complejo apo-Tf/TfR1 vuelve a la membrana celular a través de un proceso que implica a la proteína Sec1511, donde la apo-Tf es liberada al torrente sanguíneo y queda disponible para recapturar hierro circulante. La vida media de la transferrina en los humanos es de unos 8 días, mientras que el ciclo de incorporación de hierro a las células es completado en 5-20 minutos, según el tipo de célula. Por tanto, cada molécula de transferrina puede realizar cientos de ciclos de unión y liberación de hierro durante su periodo de vida (Gkouvatsos et al., 2011).

Se ha descrito también el receptor de transferrina 2 (TfR2), el cual se expresa fundamentalmente en hepatocitos y tiene menor afinidad por la holo-transferrina que su homólogo, el TfR1 (Kawabata et al., 1999). En un principio se sugirió que el TfR2 podría estar implicado en la captación celular de hierro

de baja afinidad. Sin embargo, la limitada distribución del TfR2 en el resto de los tejidos y el hecho de que alteraciones en la proteína no estén relacionadas con defectos del transporte de hierro en los tejidos, han refutado esta teoría (Gkouvatsos et al., 2011). Como veremos más adelante en esta revisión, el TfR2 tiene un papel fundamental en la regulación de la homeostasis del hierro.

2.3 Utilización de hierro: Eritropoyesis

La gran mayoría del hierro circulante es utilizado para la síntesis de hemo, realizada por los eritroblastos o células eritropoyéticas de la médula ósea. La captación de hierro se realiza fundamentalmente a través del TfR1, cuya expresión varía dependiendo de la necesidad de hierro de la célula. Por ejemplo, los precursores eritroides, que requieren elevadas cantidades de hierro para la producción de hemoglobina, pueden expresar hasta 10^6 moléculas de TfR1 por célula (Iolascon et al., 2009). La gran mayoría del hierro captado por las células eritropoyéticas es destinado a la mitocondria, donde atraviesa la membrana mitocondrial mediante la proteína mitoferrina, y se utiliza para la síntesis del grupo hemo y del complejo proteico hierro-sulfuro (ISC, *iron-sulfur clusters*) (Napier et al., 2005). El hemo es el grupo prostético de varios tipos de proteínas, incluidas la hemoglobina, la mioglobina, el citocromo p450, la catalasa y la peroxidasa, las cuales tienen importantes funciones en la eritropoyesis y en los eritrocitos. En los mamíferos, la ruta de síntesis de hemo implica la acción de 8 enzimas, localizadas tanto en la mitocondria como en el citosol. En la formación de los ISC, componentes fundamentales de la cadena respiratoria de electrones, también están implicados tanto la mitocondria como el citosol (Iolascon et al., 2009). La entrada de hierro en la mitocondria está estrictamente regulada, ya que un exceso podría provocar la generación de especies reactivas de oxígeno, mientras que un déficit conllevaría la disminución de la síntesis de hemo e ISC, comprometiendo numerosas funciones del organismo (Ponka, 1997).

2.4 Reciclado de hierro

Como se ha descrito anteriormente, la mayor parte del hierro presente en nuestro organismo está asociado a la hemoglobina formando parte de los eritrocitos. La fagocitosis de los eritrocitos senescentes llevada a cabo por los

macrófagos asegura un eficiente reciclado de hierro, ya que la cantidad reciclada diariamente es aproximadamente 20-25 mg, suficiente para asegurar los requerimientos de la eritropoyesis (Knutson y Wessling-Resnick, 2003). Este mecanismo es llevado a cabo fundamentalmente por los macrófagos del bazo y la médula ósea, y en menor medida, por las células K  pffer del hígado. Las modificaciones bioquímicas que se producen en la membrana de los eritrocitos durante la senescencia, como la externalización de la fosfatidil-serina, la peroxidación de la membrana lipoproteica, la pérdida de los residuos de ácido siálico y la formación de antígenos de senescencia, constituyen señales esenciales para el macrófago, que logra así identificar a los eritrocitos que deben ser eliminados.

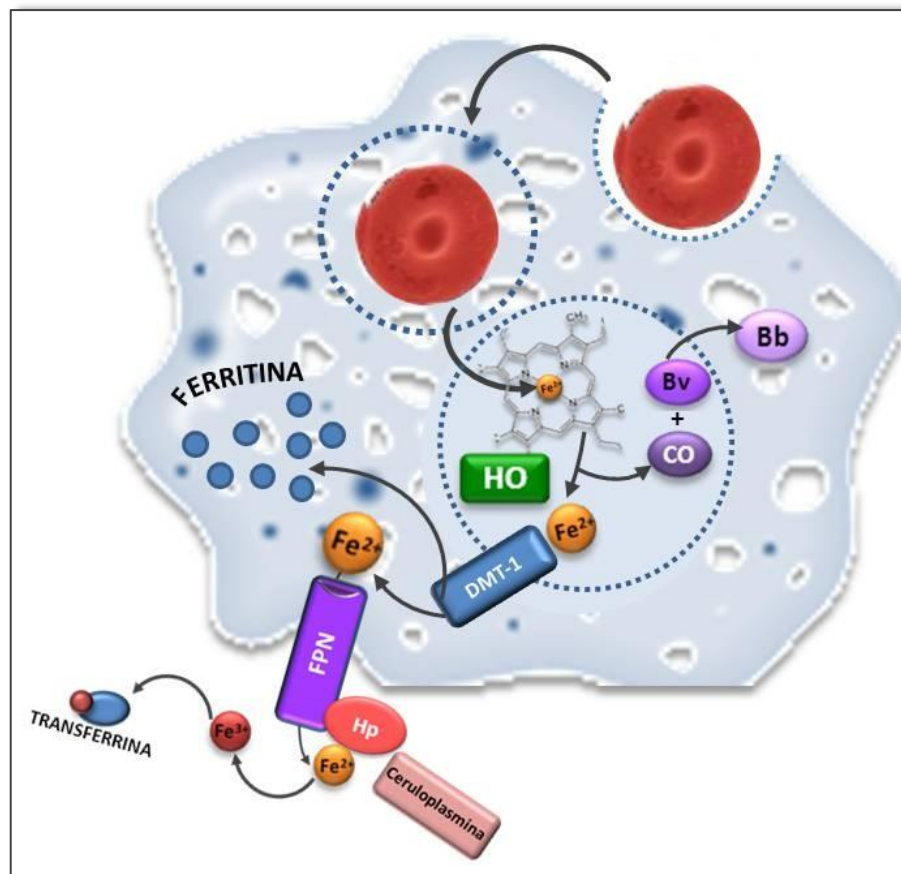


Figura 4. Reciclado de hierro llevado a cabo por los macrófagos. Transportador divalente de metales (DMT-1), hemo-oxigenasa (HO), monóxido de carbono (CO), biliverdina IX-   (Bv), bilirrubina IX-   (Bb), ferroportina (FPN) y hepastina (Hp).

Después del reconocimiento inicial, asegurado por la interacción de receptores específicos de la membrana del macrófago con el glóbulo rojo, éste es internalizado al citosol del macrófago mediante fagocitosis (Figura 4). El eritrocito fagocitado es degradado por la formación del fagosoma, que puede incluir la acción del retículo endoplasmático (Desjardins, 2003), liberándose el grupo hemo. Bajo la acción de un complejo enzimático anclado en la membrana del retículo endoplasmático que incluye NADPH-citocromo c reductasa, hemoxigenasa y biliverdina reductasa, se libera el Fe^{2+} del grupo hemo produciéndose CO y bilirrubina. El hierro liberado por el catabolismo de los glóbulos rojos senescentes puede quedarse almacenado en forma de ferritina en el interior del enterocito o volver a ser recirculado al torrente sanguíneo a través de la proteína ferroportina (FPN). De la misma manera que en el enterocito, el Fe^{2+} deberá ser oxidado a Fe^{3+} a través de la ceruloplasmina para su unión con la transferrina (Beaumont y Delaby, 2009).

2.5 Almacenamiento

En situaciones normales, aproximadamente el 95% del hierro almacenado en el organismo se encuentra en forma de ferritina, principalmente en el hígado, aunque también en otros tejidos. El 5% restante se encuentra en forma de hemosiderina, la cual es producto de la degradación de la ferritina, presente fundamentalmente en las células Küpffer del hígado.

La ferritina es una proteína constituida por 24 subunidades, las cuales forman una estructura casi esférica que delimita una gran cavidad, diseñada para acomodar unos 4500 átomos de hierro. Su función principal es la de almacenar hierro de una forma dinámica, protegiendo a la célula de los radicales libres derivados de la reacción de *Fenton*, y permitiendo la liberación del mineral según la demanda del organismo (Friedman et al., 2011). Las células eucariotas tienen principalmente 2 genes funcionales de ferritina citosólica que codifican dos subunidades diferentes: la subunidad H (*heavy*) y la subunidad L (*light*). En los mamíferos, las dos subunidades tienen baja tendencia a formar homopolímeros, y se unen en diferente proporción originando un gran número de isoformas (H₂₄L₀, H₂₂L₂...H₀L₂₄), cuya distribución es específica según los tejidos (Arosio et al., 2009).

La subunidad H tiene un sitio de unión de Fe^{2+} con actividad ferroxidasa, que cataliza la oxidación aerobia de Fe^{2+} , consumiendo O_2 y dando lugar a H_2O_2 , el cual será usado para oxidar más Fe^{2+} . El uso del H_2O_2 para el almacenamiento de Fe^{2+} proporciona a esta subunidad una función antioxidante (Zhao et al., 2006). La subunidad L no tiene actividad enzimática, con lo que es más estable, pero tiene una elevada eficacia en la transferencia de hierro hacia el citosol, incluso cuando está presente en bajas cantidades. Por tanto, las diferentes combinaciones de las dos subunidades conllevan pequeños cambios de funcionalidad de la ferritina, lo que explica su diferente distribución en los tejidos. Así, la subunidad H es más frecuente en el cerebro y el corazón, donde es más importante la función antioxidante; mientras que la subunidad L es más frecuente en el hígado, ya que es más apropiada para almacenar mayor cantidad de hierro a largo plazo (Harrison y Arosio, 1996). Todavía se desconoce el mecanismo y la regulación de la liberación y reutilización del hierro de la ferritina. Estudios in vitro sugieren que la liberación se produce a través de canales hidrofílicos; mientras que estudios in-vivo sugieren que la liberación del hierro se produce por la degradación de la proteína en los liposomas (Arosio et al., 2009). Respecto a la expresión de ferritina, es regulada a través de las IRPs, las cuales se unen a los IREs (*iron responsive elements*), presentes en el ARNm tanto de la subunidad H como de la subunidad L cuando los niveles de hierro decrecen. Esto supone un bloqueo de la traslación, y por tanto, la inhibición de la producción de ferritina.

3 Regulación de la homeostasis del hierro

Desde antiguo siempre se había considerado que la regulación de la homeostasis del hierro debía ser un proceso coordinado a nivel sistémico, puesto que se observó que diferentes estados de hierro del individuo suponían diferencias en la absorción intestinal y en el reciclado de hierro por parte de los macrófagos. Sin embargo, no ha sido hasta hace 11 años cuando se describió por primera vez la que se considera la “hormona reguladora de la homeostasis del hierro”, denominada hepcidina (Ganz, 2011).

3.1 Hepcidina

La hepcidina se considera el núcleo central de la regulación sistémica de la homeostasis del hierro, ya que controla de manera coordinada la liberación de hierro de los tres reservorios principales, inhibiendo el flujo de salida del hierro absorbido por los enterocitos, del reciclado por los macrófagos y del almacenado en el hígado (Figura 5). Así, en situaciones de altos niveles de hierro, se sintetiza hepcidina en los hepatocitos y ésta impide el flujo de hierro a la circulación por su unión con la ferroportina (FPN), mientras que en situaciones de bajos niveles de hierro no se sintetiza hepcidina y el hierro puede ser liberado a la circulación. Además, la hepcidina presenta cierta actividad antimicrobiana *in vitro*, aunque no ha sido demostrada *in vivo*.

Esta hormona es un péptido bioactivo formado por 25 aminoácidos que forman una estructura de horquilla, con cuatro enlaces disulfuro intramoleculares. Se genera a partir de la preprohepcidina, de 84 aminoácidos de longitud, por la segmentación mediante el enzima furina. Una vez sintetizada en los hepatocitos, se libera a la circulación unida a la α 2-macroglobulina (Hentze et al., 2010).

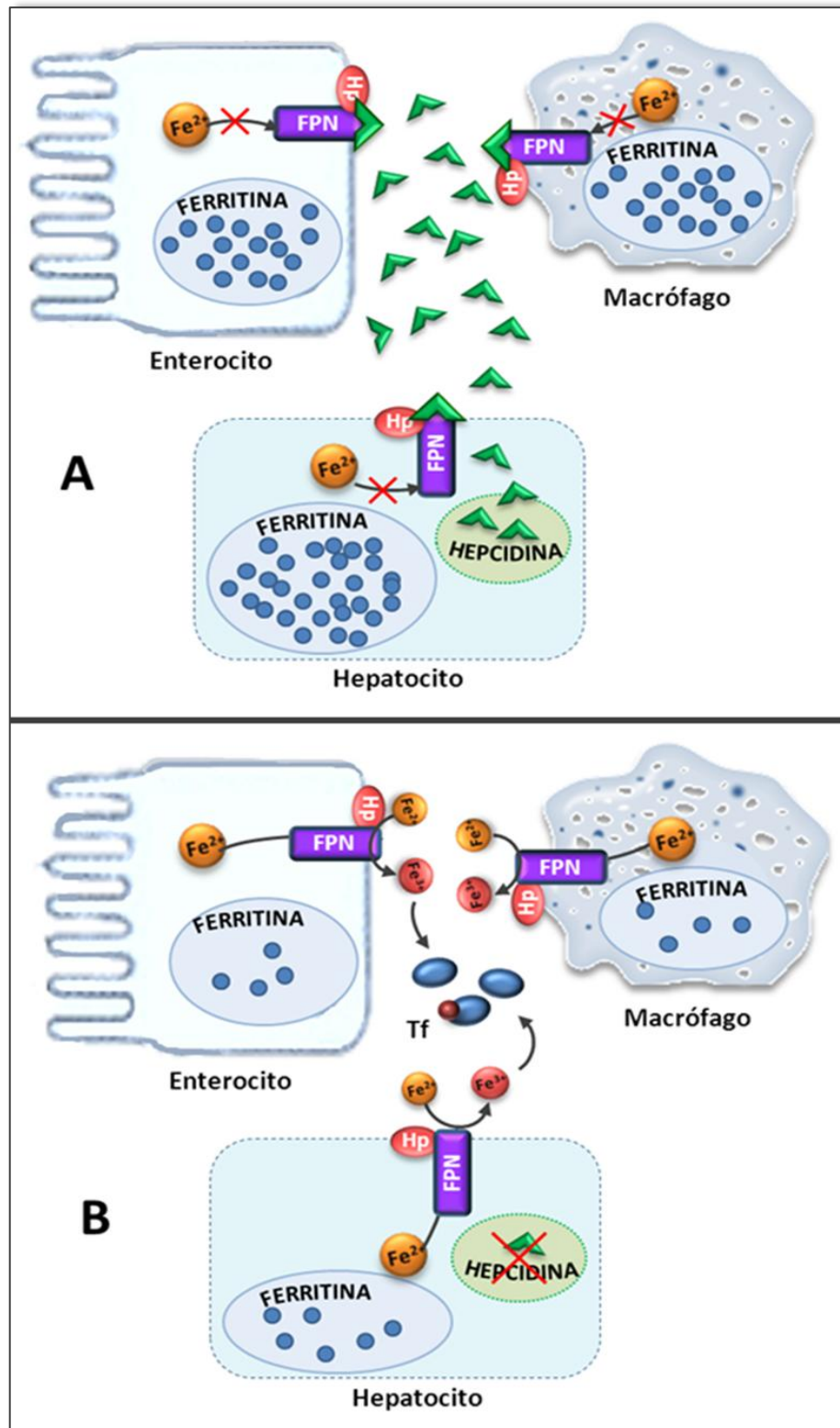


Figura 5. Regulación de la homeostasis del hierro. A) En situaciones de altos niveles de hierro, se sintetiza hepcidina en los hepatocitos y ésta impide el flujo de hierro a la circulación por su unión con la ferroportina (FPN). B) En situaciones de bajos niveles de hierro, no se sintetiza hepcidina y el hierro puede ser liberado a la circulación. Hepastina (Hp), transferrina (Tf).

La hepcidina impide el paso de hierro a la circulación por unión directa con la FPN presente en la membrana celular (Figura 6). Esta unión se produce entre el bucle de la FPN, que contiene una cisteína en la posición 326, y el fragmento de 5 aminoácidos N-terminal de la hepcidina (Nemeth et al., 2006; Fernandes et al., 2009) e induce la fosforilación de las tirosinas, iniciando así su internalización en la célula. Recientemente se ha descrito que en este proceso de fosforilación también participa la proteína Janus Kinase 2 (Jak2) (De Domenico et al., 2009). Una vez internalizada, la FPN es desfosforilada y se produce la activación y posterior unión de las enzimas ubiquitin ligasas, imprescindibles para su final degradación en los lisosomas (Nemeth et al., 2004). La hepcidina que no se une con la ferroportina se elimina por filtración glomerular en el riñón (Hentze et al., 2010).

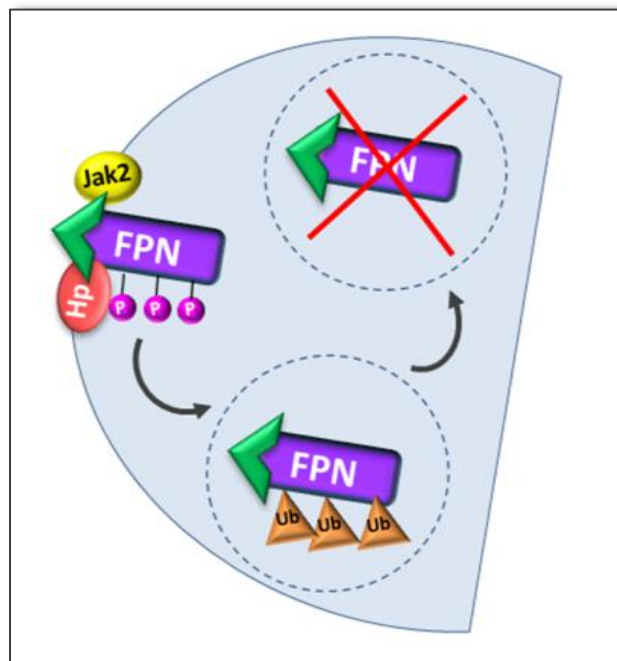


Figura 6. Proceso de degradación de la ferroportina (FPN) por la hepcidina. Hepastina (Hp), enzimas ubiquinín ligasas (Ub), enzima Janus Kinase 2 (Jak2).

A pesar del control a nivel sistémico que ejerce la hepcidina, se ha sugerido que la rapidez de respuesta de la proteína es diferente según el tipo de célula y tejido donde actúe. Tras su liberación a la circulación, la hepcidina actuaría en primer lugar en el macrófago, mientras que los enterocitos del duodeno

parecen ser menos sensibles en los estados iniciales de aumento de hepcidina en sangre (Chaston et al., 2008).

Otra hipótesis sugerida recientemente es que para coordinar la absorción a nivel intestinal realizada en la membrana apical del enterocito y el flujo de hierro por la membrana basolateral, el efecto de la hepcidina sobre la FPN debe estar comunicado con la membrana apical para disminuir también la absorción de hierro dietético. Tres mecanismos podrían estar implicados: en el primero, la acumulación de hierro en el interior del enterocito por la inhibición de la FPN inactivaría las IRPs, inhibiendo la síntesis de DMT-1. En el segundo, la inhibición de DMT-1 se llevaría a cabo por la hidroxilación del HIF α (*hipoxia-inducible factor*) también debido a la acumulación de hierro en el citosol. Por último, la unión de la hepcidina con la FPN podría activar las ubiquitin ligasas en el citoplasma, lo que daría lugar a su unión y posterior degradación del DMT-1, y posiblemente de otros transportadores de membrana (Ganz y Nemeth, 2012).

3.2 Regulación de la hepcidina

El gen que codifica la hepcidina (*HAMP*) se expresa fundamentalmente en hígado, aunque también se ha detectado expresión de la proteína en menor cantidad en corazón, cordón umbilical, estómago, intestino, tejido adiposo y pulmones (Darshan y Anderson, 2009). La regulación de la expresión de hepcidina en el hepatocito se ejerce a nivel transcripcional por múltiples señales entre las que se incluyen: los niveles de hierro circulante, los almacenes de hierro, la actividad eritropoyética, la hipoxia y los estados de inflamación o infección (Figura 7).

3.2.1 Regulación por los niveles de hierro circulante

La modulación de la hepcidina por los niveles de hierro circulante parece estar mediada a través de las interacciones que se producen entre la proteína HFE y los receptores de transferrina 1 y 2 (TfR1 y TfR2). Dichas interacciones dependen de la saturación de la transferrina plasmática.

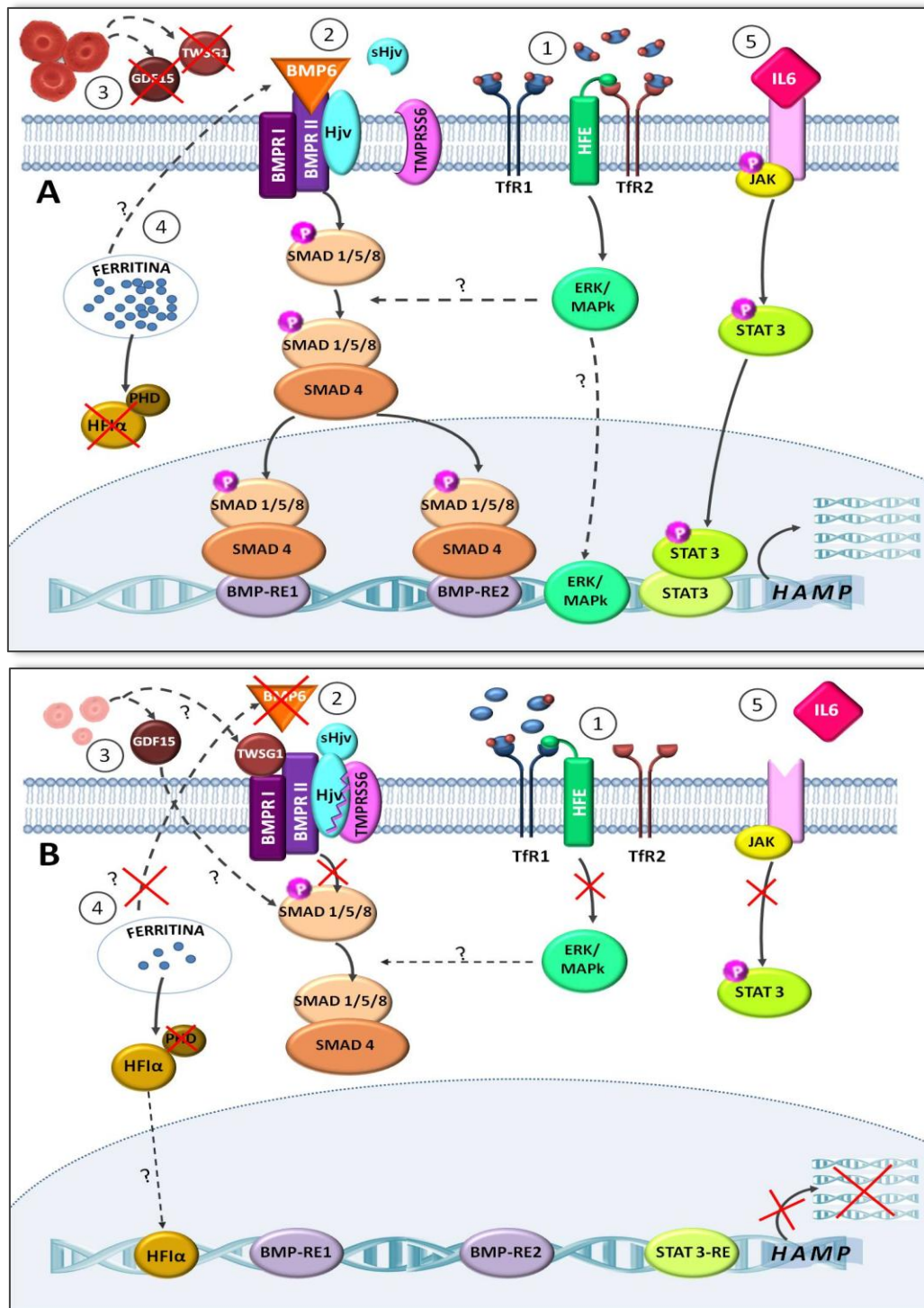


Figura 7. Regulación de la hepcidina. A) En situaciones de altos niveles de hierro, aumenta la expresión de hepcidina. B) En situaciones de bajos niveles de hierro, se inhibe la expresión de hepcidina. Las diferentes rutas de regulación son: 1) por los niveles de hierro circulante, 2) por los almacenes de hierro, 3) por señales eritropoyéticas, 4) a través del factor inducible de hipoxia, 5) por estados de inflamación o infección. Gen de la hepcidina (*HAMP*), receptor de transferrina 1 (TfR1), receptor de transferrina 2 (TfR2), bone morphogenetic protein 6 (BMP6), receptores de BMP (BMPRI y BMPRII), elementos sensibles de BMP (BMP-RE1 y BMP-RE2), hemojuvelina (Hjv), matriptasa-2 (TMPRSS6), forma soluble de hemojuvelina (sHjv), señales eritropoyéticas (GDF15 y TWSG1), factor inducible de hipoxia (HIF α), prolil-hidroxilasa dependiente de hierro (PHD), citoquina inflamatoria IL6.

El modelo propuesto es el siguiente: en situaciones de bajos niveles de hierro circulante, el TfR1 secuestraría al HFE, impidiendo su unión con el TfR2, y por tanto, inhibiendo la expresión de hepcidina (Figura 7B-1). Cuando mejora el estado de hierro y la saturación de transferrina aumenta, la holo-Tf desplazaría el HFE del TfR1 permitiendo su unión con el TfR2 y activando la producción de hepcidina por la formación del complejo holo-Tf/HFE/TfR2 (Figura 7A-1) (Gao et al., 2009). Estudios cristalográficos han demostrado que la zona de unión entre el TfR1 y la holo-Tf y el HFE es la misma, confirmando la hipótesis de que la holo-Tf y el HFE compiten en la unión por el TfR1, mientras que el TfR2 se puede unir simultáneamente al HFE y a la holo-Tf, permitiendo la formación del complejo regulador (Gkouvatsos et al., 2011). La función reguladora de la holo-Tf se ha confirmado en modelos animales, en los cuales se observó que la inyección de ésta aumentaba el ARNm de hepcidina, mientras que la inyección de un suero control o de apo-Tf no producía ese efecto (Ramos et al., 2011). Sin embargo, se desconoce la vía de transducción de señales por la que el complejo holo-Tf/HFE/TfR2 regula la expresión de hepcidina. Un hipótesis es que podría ser la vía ERK/MAP quinasa, que se activa en hepatocitos tras su tratamiento con holo-Tf, aunque hay múltiples datos que sugieren que podría intervenir otra de las vías de regulación (Ramey et al., 2009).

3.2.2 Regulación por los almacenes de hierro

Los almacenes de hierro hepáticos regulan la expresión de hepcidina fundamentalmente a través de la vía de transducción de señales de las BMPs (*bone morphogenetic proteins*) (Kautz et al., 2008). La activación de los receptores de BMP (BMPR-I y BMPR-II) por la unión de la proteína BMP produce la fosforilación de las proteínas intracelulares SMAD1, SMAD5 y SMAD8 (Figura 7A-2). Posteriormente, el complejo fosforilado p-SMAD1/5/8 interacciona con el SMAD4, y todo ello se traslada al núcleo, donde se une a los dos elementos sensibles de BMP (*BMP responsive elements*), el BMP-RE1 y BMP-RE2, situados en la zona proximal y distal del promotor de la hepcidina, iniciando así la activación de la transcripción (Casanovas et al., 2009). Entre los diferentes tipos de BMPs que inducen la expresión de hepcidina in vitro, la BMP6 parece ser la más relevante a nivel fisiológico. En estudios en animales se ha observado que la alteración de la producción de BMP6 conlleva la

disminución de hepcidina, independientemente de la presencia de las otras BMPs; mientras que su inyección aumenta los niveles de hepcidina (Andriopoulos et al., 2009). Además, se ha observado que los niveles de ARNm de la BMP6 están correlacionados positivamente con el contenido de hierro en hígado, sugiriendo que su expresión en los hepatocitos podría estar regulada por los almacenes de hierro (Ramos et al., 2011).

La proteína hemojuvelina (Hjv), codificada por el gen *HFE2*, actúa como co-receptor formando complejos con los dos receptores de BMP, el tipo I y el tipo II (BMPR-I y BMPR-II). Esta unión de la Hjv aumenta la transducción de señales de la ruta BMP/SMAD y por tanto, incrementa la producción de hepcidina (Figura 7A-2). La Hjv se expresa en hígado y en músculo esquelético y se une a la membrana celular a través de un GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) situado en su carbono terminal (Babitt et al., 2006). La Hjv asociada a la membrana puede ser inactivada mediante escisión por la proteína matriptasa-2 (TMPRSS6) (Figura 7B-2). Esto atenuaría la vía BMP/SMAD, actuando la TMPRSS6 como inhibidor de la expresión de hepcidina (Silvestri et al., 2008). Estudios en animales muestran que cuando disminuyen los niveles de hierro aumenta la síntesis de TMPRSS6, lo que apoya su papel inhibitorio (Meynard et al., 2011).

Por otro lado, la forma soluble de hemojuvelina (sHjv), que podría derivar del músculo, también se ha propuesto como regulador negativo de la hepcidina. Estudios in vitro han descrito que la sHjv se uniría a la Hjv de membrana, impidiendo su unión con los receptores de BMP e inhibiendo la ruta de síntesis de la hepcidina. Sin embargo, esto todavía no ha podido ser confirmado por estudios en animales (Chen et al., 2011).

3.2.3 Regulación por señales eritropoyéticas

La formación de eritrocitos requiere grandes cantidades de hierro, por lo que la inhibición de la expresión de hepcidina para fomentar la eritropoyesis tiene una gran relevancia a nivel fisiológico. Se ha sugerido que las proteínas GDF15 (*growth differentiation factor 15*) y TWSG1 (*twisted gastrulation-1*), liberadas por precursores eritroides, podrían actuar como señales eritropoyéticas, induciendo la inhibición de la síntesis de hepcidina a través de la vía de transducción BMP/SMAD (Figura 7B-3) (Tanno et al., 2007 y 2009). No

obstante, todavía no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares implicados en este proceso y faltan estudios en humanos que confirmen la posible función de las proteínas GDF15 y TWSG1.

3.2.4 Regulación a través del factor inducible de hipoxia (HFI)

Un estudio realizado en animales, en el que se obtuvo que la supresión de la síntesis de la subunidad HFI α se relacionaba con menores niveles de hepcidina, sugirió la posibilidad de que el HFI podía tener un papel en la regulación de la hepcidina (Figura 7B-4) (Peyssonnaud et al., 2007). Sin embargo, estudios posteriores indican que el HFI parece no regular la expresión de la hepcidina por unión directa con su promotor (Volke et al., 2009). Más recientemente se ha descrito que el HFI y la hepcidina podrían relacionarse a través de la eritropoyetina (EPO), ya que en situaciones de hipoxia aumenta la síntesis de EPO, que induce la estimulación de la eritropoyesis, y como se ha presentado en el apartado anterior, inhibe de la expresión de hepcidina (Hentze et al., 2010).

3.2.5 Regulación por estados de inflamación o infección

Las citoquinas inflamatorias IL1 e IL6 son potentes moduladores de la expresión de la hepcidina. La IL6 activa la vía de transducción de señales JAK/STAT (*Janus kinase/signal traducer and activator of transcription*), que activa el promotor de la hepcidina a través de la unión del complejo STAT a una región cercana al sitio de inicio de la transcripción de la proteína (Figura 7A-5) (Fleming, 2007). Éste, y posiblemente otros mecanismos, explican el aumento de la síntesis de hepcidina y los niveles séricos de la proteína en estados de infección o inflamación, así como la disminución de los niveles de hierro observados en sujetos con cuadros de infección o enfermedades inflamatorias. Aunque no se ha demostrado, se ha sugerido que esta ruta tiene más un sentido de protección contra enfermedades infecciosas que de regulación del metabolismo del hierro, ya que al disminuir el hierro sistémico se limitaría la multiplicación de los microorganismos dependientes de hierro (Ganz y Nemeth, 2012).

4 Variantes genéticas implicadas en el metabolismo del hierro

La mayoría de los genes implicados en el metabolismo del hierro se han identificado en los últimos años. La caracterización de estos genes ha sido muy importante, no sólo para aumentar el conocimiento acerca de la regulación de la homeostasis del hierro, sino también para conocer cómo pueden influir determinadas variantes genéticas en el metabolismo del mineral.

4.1 Alteraciones del metabolismo del hierro de origen genético

Determinadas mutaciones de genes implicados en el metabolismo del hierro pueden dar lugar a la alteración de la regulación del mineral, causando trastornos por sobrecarga o por déficit de hierro (Tabla 1). Algunas alteraciones del metabolismo del hierro de origen genético son difícilmente tratables y pueden tener elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (Brissot et al., 2011).

4.1.1 Variantes genéticas que causan sobrecarga de hierro

La sobrecarga de hierro o hemocromatosis, descrita por primera vez en 1865, es un síndrome caracterizado por elevados depósitos de hierro hepático y acumulación tóxica del mineral en las células parenquimales de diversos órganos. La mayoría de los casos, también denominados sobrecarga de hierro primaria o heredada, son debidos a mutaciones de genes reguladores que conllevan la inhibición de la producción de hepcidina, y por tanto, el aumento indiscriminado de absorción de hierro y acumulación del mismo en el organismo. También se ha descrito la sobrecarga de hierro secundaria, debido a un exceso de administración de hierro, por ejemplo en casos de transfusiones de sangre crónicas (Siddique y Kwodley, 2012). Ello se explica porque, aun sin existir mutación genética, el organismo no dispone de vías eficaces de excreción del metal.

4.1.1.1 Hemocromatosis hereditaria o hemocromatosis tipo 1

La hemocromatosis hereditaria (HH) por mutación del gen *HFE* es la afección monogénica más común en Caucásicos y la alteración del metabolismo del hierro de origen genético más frecuente, ya que más del 90% de las sobrecargas de hierro se deben a mutaciones del *HFE* (Camaschella y Strati, 2010). La enfermedad es autosómica recesiva, y aunque se han identificado varias mutaciones del *HFE*, las más relevantes a nivel clínico son la C282Y y la H63D. La mutación C282Y, situada en el brazo corto del cromosoma 6, conlleva la sustitución del aminoácido cisteína por tirosina en la posición 282 de la proteína HFE. La mutación H63D se caracteriza por el cambio de histidina a ácido aspártico en el aminoácido 63 (Feder et al., 1996).

La prevalencia homocigótica del C282Y es de 1 entre 250 personas en población general y de 1 entre 200 en individuos con ascendencia Noreuropea. La mutación H63D es más común, siendo portadora entre el 10-20% de la población con ascendencia Europea, especialmente en la cuenca mediterránea (Njajou et al., 2003). Sin embargo, la relevancia clínica de estas mutaciones es relativamente baja, ya que sólo desarrollan sobrecarga el 25-30% de los portadores homocigotos de C282Y, entre el 3-5% de los heterocigotos C282Y/H63D y una frecuencia menor los homocigotos para H63D (Bacon y Britton, 2008). La expresión completa de la enfermedad, que podría incluir cirrosis, enfermedad cardiovascular, diabetes, hipogonadismo, artritis y pigmentación de la piel, se desarrolla raramente y suele estar asociada con otros factores. Así, el grado de la sobrecarga está influenciado por la edad, el sexo, otras posibles mutaciones asociadas y diversos factores ambientales, como las pérdidas menstruales, la dieta, el consumo de alcohol, la donación de sangre, etc. De hecho, datos de un estudio poblacional de 12 años de seguimiento en más de 31000 personas con ascendencia Noreuropea mostró que el desarrollo de la sobrecarga de hierro (considerada como valores de ferritina por encima de 1000 ng/mL) en sujetos homocigotos para el C282Y era bastante más frecuente en hombres de más de 40 años que en mujeres (28,4% frente a un 1,2%) (Allen et al., 2008).

Tabla 1. Características de las alteraciones del metabolismo del hierro de origen genético

TIPO	GEN	FRECUENCIA	HERENCIA	PARÁMETROS HIERRO	MECANISMO	CARACTERÍSTICAS
Alteraciones por sobrecarga de hierro						
Tipo 1: Hemocromatosis clásica	<i>HFE</i>	Común	AR	TS y Ft elevadas	Disminución síntesis hepcidina	El desarrollo de la enfermedad es más común en hombres a partir de 40 años.
Tipo 2: Hemocromatosis juvenil	2A: <i>HJV</i> 2B: <i>HAMP</i>	Infrecuente	AR	TS y Ft elevadas	Inhibición de la síntesis de hepcidina	Enfermedad más severa. Desarrollo a partir de los 30 años, afectando los dos sexos.
Tipo 3: Hemocromatosis por mutaciones del <i>TfR2</i>	<i>TfR2</i>	Muy infrecuente	AR	TS y Ft elevadas	Disminución síntesis hepcidina	Se manifiestan a edades más tempranas, enfermedad severa.
Tipo 4: "Enfermedad de la ferroportina (FPN)"						
Clásica	<i>SLC40A1</i>	Infrecuente	AD	TS baja o normal y Ft elevada	Pérdida de actividad de la FPN	Acumulación de Fe en los macrófagos y falta de hierro en los tejidos (anemia moderada).
No clásica	<i>SLC40A1</i>	Infrecuente	AD	TS y Ft elevadas	FPN resistente a la degradación por hepcidina	Acumulación de Fe en hepatocitos, acumulación de hierro en los tejidos.
Alteraciones por deficiencia de hierro						
Anemia ferropénica refractaria (IRIDA)	<i>TMPRSS6</i>	Infrecuente	AR	Anemia microcítica hipocrómica, TS y Ft bajas	Sobre-expresión de hepcidina	Desarrollo en niños, no responden al tratamiento oral ni parenteral con hierro.
Hipotransferrinemia	<i>Tf</i>	Muy infrecuente	AR	Anemia microcítica hipocrómica, TS y Ft elevadas	Disminución de síntesis de transferrina	Anemia eritrocitaria y acumulación de Fe en hígado y otros tejidos. Respuesta al reemplazamiento de transferrina
Deficiencia de DMT-1	<i>DMT-1</i>	Muy infrecuente	AR	Anemia microcítica hipocrómica, TS y Ft elevadas	Falta de hierro en células eritroides.	Anemia eritrocitaria y acumulación de Fe en hígado y otros tejidos. Respuesta al tratamiento con eritropoyetina
Aceruloplasminemia	<i>CP</i>	Muy infrecuente	AR	TS baja y Ft elevada	Pérdida de actividad de la ceruloplasmina	Anemia moderada y acumulación de Fe en hígado y otros tejidos

AR: autosómico recesivo; AD: autosómico dominante; TS: saturación de la transferrina; Ft: ferritina sérica; FPN: ferroportina; Tf: transferrina; TfR2: receptor de transferrina 2; TMPRSS6: matriptasa-2; DMT-1: *divalent metal transporter 1*; CP: ceruloplasmina *HJV*: hemojuvelina; *HAMP*: gen de la hepcidina; *SLC40A1*: gen de la FPN

4.1.1.2 Hemocromatosis juvenil o hemocromatosis tipo 2

La hemocromatosis juvenil (JH) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por un acúmulo masivo de hierro en el hígado y en glándulas endocrinas. Al contrario que los pacientes de la HH clásica, los pacientes con JH desarrollan la enfermedad a edades más tempranas, normalmente en la tercera década de la vida. Además, este síndrome afecta a los dos géneros por igual y cursa de forma más rápida y severa, ya que conlleva la inhibición total de la producción de hepcidina (Kelly et al., 1998). Cuadros clínicos frecuentes son el hipogonadismo y la enfermedad cardíaca. Dependiendo del gen implicado, la JH se divide en dos subtipos, aunque la presentación clínica es la misma. El tipo 2A es debido a mutaciones del gen *HJV*, que codifica a la

proteína hemojuvelina, situado en el cromosoma 1. Entre las diferentes mutaciones que se han identificado, la más común es la G320V (Papanikolaou et al., 2004). El tipo 2B es debido a mutaciones en el gen que codifica la hepcidina, el *HAMP*, situado en el cromosoma 19 (Roetto et al., 2003).

4.1.1.3 Hemocromatosis por mutaciones del Tfr2 o hemocromatosis tipo 3

La hemocromatosis tipo 3, debida a mutaciones del gen *Tfr2* situado en el cromosoma 7, es poco frecuente. Se han descrito varias mutaciones del gen *Tfr2*, siendo la primera la Y250X, que supone la interrupción de la síntesis de la proteína Tfr2 en el aminoácido 250 (Camaschella et al., 2000). Comparada con la HH, los casos de hemocromatosis de tipo 3 se manifiestan a edades más tempranas, y puede cursar con fatiga, astralgia, cirrosis, diabetes melitus y artritis, aunque en algunos pacientes la enfermedad no llega a desarrollarse (Girelli et al., 2002).

4.1.1.4 Sobrecarga de hierro por alteración de la ferroportina o hemocromatosis tipo 4

La hemocromatosis tipo 4 es el síndrome heredable de sobrecarga de hierro más común después de la HH, aunque con características genéticas, clínicas, bioquímicas e histológicas diferentes. Al contrario que los otros síndromes de sobrecarga, el tipo 4 es autosómico dominante y se da por mutaciones del gen de la ferroportina, el *SLC40A1* (Devalia et al., 2002). Existen 2 subtipos, la "enfermedad de la ferroportina" clásica y la no clásica. El subtipo clásico se caracteriza por hiperferritinemia, saturación de la transferrina normal o baja y acumulación de hierro en los macrófagos. Las mutaciones asociadas a esta enfermedad causan pérdida de la actividad de la FPN, con lo que disminuye la liberación del hierro a la circulación, reteniéndose especialmente en los macrófagos, produciéndose altos niveles de ferritina. La disminución del hierro circulante origina la disminución de la saturación de la transferrina e incluso puede causar una anemia moderada, debido a la falta de hierro en los tejidos (Pietrangelo, 2004). El subtipo no clásico se caracteriza por hiperferritinemia, saturación de la transferrina aumentada y acumulación de hierro en hepatocitos, más que en los macrófagos. Esta condición está asociada con mutaciones que resultan en una actividad normal de la FPN, pero resistente a

la internalización y degradación por parte de la hepcidina, por lo que su falta de regulación hace que la FPN esté siempre activa (Letocart et al., 2009).

4.1.2 Variantes genéticas que causan deficiencia de hierro

Defectos genéticos poco frecuentes en proteínas implicadas en la regulación, el transporte o el reciclado de hierro pueden dar lugar a anemia por deficiencia de hierro. En algunos casos, la anemia está asociada con sobrecarga de hierro. Este tipo de alteraciones que comparten algunas características se denominan “anemias por sobrecarga de hierro” (*iron loading anaemias*).

4.1.2.1 Anemia ferropénica refractaria (IRIDA)

La IRIDA (*iron refractory iron-deficiency anaemia*), es una alteración autosómica recesiva recientemente descrita que se debe fundamentalmente a mutaciones en el gen *TMPRSS6*, que codifica la matriptasa-2. La pérdida de funcionalidad de la proteína produce sobre-expresión de la hepcidina, lo que produce una disminución de la absorción de hierro a nivel intestinal y un bloqueo del reciclado de hierro por parte de los macrófagos. Esta alteración se caracteriza por causar una anemia microcítica hipocrómica, bajos niveles de hierro sérico y de saturación de la transferrina, niveles variables de ferritina y altos niveles en suero y orina de hepcidina. Los pacientes con esta enfermedad suelen ser niños, que además de desarrollar una anemia moderada, no responden al tratamiento oral ni parenteral con hierro (Finberg et al., 2008).

4.1.2.2 Hipotransferrinemia

Es una alteración autosómica recesiva muy infrecuente que causa la inhibición de la síntesis de transferrina, originando un suministro insuficiente de hierro a los tejidos. Esto da lugar a una anemia microcítica hipocrómica severa, lo que desencadena un aumento en la absorción a nivel intestinal y en la liberación de hierro de los macrófagos (por la regulación de la hepcidina). En ausencia de transferrina, este hierro tiende a acumularse de forma tóxica en el hígado y en otros tejidos. Los pacientes que tienen este trastorno presentan niveles elevados de saturación de la transferrina y ferritina, y suelen responder bien al reemplazamiento de transferrina mediante transfusiones de sangre (Trombini et al., 2007).

4.1.2.3 Deficiencia de DMT-1

Las mutaciones en el gen que codifica el transportador DMT-1 pueden dar lugar a enfermedades autosómicas recesivas, aunque son muy infrecuentes. La alteración de la proteína puede originar anemia microcítica, debido a que el DMT-1 es esencial en el transporte de hierro al endosoma en células eritroides. Al igual que en la hipotransferrinemia, la disminución de hepcidina por la anemia microcítica causa sobrecarga de hierro. Los pacientes con este trastorno presentan elevada saturación de transferrina y ferritina, y responden parcialmente a un tratamiento con eritropoyetina (Iolascon et al., 2009).

4.1.2.4 Aceruloplasminemia

Este infrecuente desorden recesivo, se refiere a mutaciones del gen *CP* que afectan la funcionalidad de la ceruloplasmina, la proteína que oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} , necesario para su incorporación a la transferrina. El cuadro clínico que daría lugar sería una combinación entre anemia moderada con baja saturación de transferrina, ferritina elevada y acumulación de hierro en hígado, páncreas y ganglios basales. La presencia de la enfermedad durante décadas podría causar anemia, diabetes, pigmentación en la retina, sobrecarga de hierro en hígado y síntomas neurológicos, como ataxia y demencia (McNeill et al., 2008).

4.2 Estudios de asociación y expresión genética

En los humanos cientos de rasgos fenotípicos determinan, entre otras cosas, la propensión que tenemos a desarrollar determinadas enfermedades. Cada fenotipo es causado por una combinación de factores heredables (variantes genéticas) e influencias medioambientales. Dilucidar la influencia de la variabilidad genética en la salud humana y en la enfermedad es uno de los mayores retos científicos del siglo XXI.

4.2.1 Tipos de variantes genéticas

Las variantes genéticas se pueden clasificar como comunes o infrecuentes según la frecuencia de presencia del alelo menor (*minor allele*) en la población, que es el alelo menos común de un polimorfismo. Las variantes comunes, también denominadas polimorfismos, son aquellas cuya frecuencia

de alelo menor (MAF, *minor allele frequency*) es igual o mayor a un 1%; mientras que las variantes infrecuentes son aquellas que se presentan en menos de un 1% de la población.

Las variantes genéticas también se pueden clasificar según su composición de nucleótidos. En el sentido más amplio, las variantes del genoma humano se pueden dividir en variantes de un solo nucleótido (SNP o single nucleotide polymorphism) o variantes estructurales, que pueden incluir inserciones, deleciones, variaciones en el número de copias, sustituciones en bloque e inversiones de secuencia de ADN (Frazer et al., 2009).

Los SNPs son el tipo de variante genética más prevalente entre individuos. Se ha estimado que el genoma humano contiene al menos 11 millones de SNPs, de los cuales 7 millones tienen un MAF superior al 5% y el resto tienen un MAF entre el 1-5% (Kruglyak y Nickerson, 2001). Los SNPs situados en un mismo intervalo genético suelen estar correlacionados unos con otros. Se dice entonces que estos SNPs están en desequilibrio de ligamento (LD, *linkage disequilibrium*), y esto implica que el conjunto de SNPs en LD se heredan en bloque (Slatkin, 2008). Sin embargo, esta correlación estructural varía de una manera compleja e indeterminada a lo largo del genoma y entre las diferentes poblaciones. Así, la determinación de tag-SNPs, que permitan identificar los bloques de SNPs en LD, ha sido una de las corrientes científicas de los últimos años. Actualmente, se han descrito los tag-SNPs de más del 80% de SNPs presentes en una frecuencia superior a 5% a lo largo del genoma (International HapMap Project, 2012).

4.2.2 Estudios de asociación genética

Con el fin de conocer cómo las variantes genéticas contribuyen a la diversidad fenotípica, se han iniciado estudios a larga escala para identificar y catalogar los nucleótidos que difieren entre individuos. Entre ellos, los más utilizados actualmente son los estudios de genotipado masivo (GWAs, *Genome-wide association studies*). Este tipo de estudios tienen como objetivo analizar en un gran número de individuos el mayor número posible de variantes genéticas, generalmente SNPs, y encontrar asociaciones entre estas y los diferentes rasgos fenotípicos de los sujetos. Debido a que la variación de determinados caracteres puede indicar presencia de una enfermedad, como por ejemplo

niveles de lípidos en sangre, glucosa, etc; encontrar variantes genéticas asociadas a estos rasgos fenotípicos puede suponer encontrar variantes genéticas implicadas en la predisposición a una enfermedad concreta (McCarthy et al., 2008).

En el caso del metabolismo del hierro, inicialmente los trabajos científicos se centraron en mutaciones concretas de genes específicos, que como hemos visto anteriormente, podían causar alteraciones en el metabolismo de hierro. Sin embargo, diversos estudios encontraron que había mutaciones, como la G277S del gen de la transferrina (*Tf*) o la mutación 17V del gen *HAMP* que no constituían un factor de riesgo de anemia por sí mismas, y se sugirió por primera vez que el estudio de haplotipos o combinaciones de polimorfismos se asociaría mejor con un estado de deficiencia de hierro (Sarriá et al., 2007a; Arroyo-Pardo y Vaquero, 2008). Más recientemente, se han desarrollado diversos GWAs que relacionan variantes de genes implicados en el metabolismo del hierro, como el gen de la transferrina (*Tf*), el *HFE*, el *TMPRSS6* y el *TfR2*, con rasgos hematológicos clínicamente relevantes como los niveles de hemoglobina, volumen corpuscular medio, ferritina sérica, transferrina y saturación de la transferrina (Soranzo et al., 2009; Ganesh et al., 2009; Chambers et al., 2009; Benyamin et al., 2009a; McLaren et al., 2011). Además, este tipo de estudios han permitido calcular el porcentaje de heredabilidad (porcentaje de la varianza fenotípica en la población atribuible a factores genéticos) de determinados parámetros del metabolismo del hierro. Así, Benyamin et al. (2009b), demostraron que tres variantes del gen *Tf* más la variante C282Y del *HFE* explican aproximadamente el 40% de la variabilidad genética de la transferrina sérica.

Todos estos estudios proporcionan nueva información acerca del metabolismo de hierro y revelan variantes genéticas que podrían predisponer a determinados individuos a desarrollar una sobrecarga o una deficiencia del mineral. Sin embargo, es necesaria la replicación de estos estudios en diferentes poblaciones para asegurar las asociaciones genotipo-fenotipo encontradas (Kraft et al., 2009).

4.2.3 Estudios de expresión genética

Un enfoque importante en el estudio de la relación gen-enfermedad es conocer la proporción de SNPs que son funcionales, es decir, que realmente contribuyen al desarrollo de los rasgos fenotípicos, y por tanto, que podrían predisponer a la enfermedad. Los SNPs pueden tener efectos a nivel transcripcional (Yuan et al., 2006), afectando:

- Las estructuras proteicas, en el caso de estar presentes en las zonas codificantes del genoma, lo que podría suponer un cambio en un aminoácido de la proteína que codifican.
- La regulación transcripcional, al afectar a los sitios de unión de los factores de transcripción en el promotor o en regiones potenciadoras intrónicas.
- La regulación del *splicing* alternativo, pudiendo dar lugar a diferentes secuencias de ARN mensajero por producir cambios en los sitios de corte entre intrones y exones.

Por tanto, el estudio de los efectos a nivel transcripcional de los SNPs asociados a marcadores del estado de hierro es esencial para conocer de qué manera estos SNPs afectan al desarrollo de los fenotipos de riesgo.

De los GWAs relacionados con el metabolismo del hierro anteriormente presentados, tan sólo uno de ellos ha planteado el estudio de los efectos de los SNPs encontrados sobre la transcripción del gen de la proteína que afectan, aunque sólo a nivel teórico (Chambers et al., 2011). De manera independiente, un estudio ha observado que la presencia del alelo menor de una variante del gen de la matriptasa-2 (*TMPRSS6*), previamente identificada en un GWAs, suponía una disminución de la transcripción de hepcidina in vitro, lo que se reflejaba en niveles más elevados de hierro y saturación de la transferrina en los sujetos que presentaban el alelo menor del SNP estudiado (Nai et al., 2011).

Tanto la detección de nuevas mutaciones genéticas asociadas al metabolismo del hierro como el estudio de su funcionalidad son campos de plena actualidad y de los que queda mucho por conocer, por lo que se hace imprescindible profundizar en estos conocimientos con el fin de conocer la base genética de las patologías del metabolismo del hierro.

5 Deficiencia de hierro y anemia ferropénica

La anemia ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) como “uno de los problemas nutricionales más comunes y difíciles de resolver del mundo actual” (WHO, 2007). Aunque puede ser causada por múltiples factores, la anemia por deficiencia de hierro, también llamada anemia ferropénica, es la más importante, ya que es la causa del 75-80% del total de las anemias (Milman, 2011).

5.1 Definición y etapas

En términos clínicos, la anemia se define como una concentración insuficiente de eritrocitos maduros circulantes en sangre (WHO, 2007). En términos de salud pública, se consideran anémicos aquellos individuos que presentan una concentración de hemoglobina inferior a dos veces la desviación estándar de la media de la población (WHO, 2001).

Cuando el aporte de hierro es insuficiente para cubrir los requerimientos se produce una deficiencia de este nutriente, la cual ocurre en diferentes etapas progresivas (Tabla 2). Primero se agotan los depósitos de hierro, situación que se caracteriza por una disminución de la concentración de ferritina sérica. En esta etapa, los tejidos que necesitan hierro son aún capaces de mantener las funciones fisiológicas normales. Si el aporte insuficiente continúa se produce una situación de deficiencia de hierro, condición en la que no existen almacenes movilizables del mineral en el organismo y el aporte de hierro a los tejidos está comprometido. Esta etapa se caracteriza por un aumento precoz de la concentración del receptor soluble de transferrina, y más tarde, un aumento de los niveles de transferrina y una disminución de su saturación, así como un aumento de la zinc protoporfirina. Si persiste el balance negativo, se llega a la situación más grave, la anemia ferropénica, en la que los glóbulos rojos de la sangre no son capaces de transportar suficiente oxígeno a las células. Clínicamente, la anemia por deficiencia de hierro se caracteriza por ser microcítica e hipocrómica, es decir, los glóbulos rojos presentan una disminución del volumen, así como un menor contenido de hemoglobina (Olivares et al., 2010).

Tabla 2. Etapas de la deficiencia de hierro (Vaquero et al., 2012).

Almacenes de hierro				
Transporte de hierro				
Eritrocitos				
	NORMAL	DEPÓSITOS FÉRRICOS DISMINUIDOS	DEFICIENCIA DE HIERRO	ANEMIA FERROPÉNICA
Hemoglobina (g/dL)	N	N	N	↓
Hematocrito (%)	N	N	N	↓
VCM (fL)	N	N	N	↓
HCM (pg)	N	N	N	↓
Índice distribución hematias (%)	N	N	N	↑
Ferritina (ng/dL)	N	↓	↓↓	↓↓
Hierro sérico (μg/dL)	N	N	↓	↓
Transferrina (mg/dL)	N	N	↑	↑
Saturación de transferrina (%)	N	N	↓	↓
sTfR(mg/L)	N	N	↑	↑
ZnPP(μmol/mol hemo)	N	N	↑	↑
Body iron (mg/kg)	N	↓	↓↓	↓↓

N: normal; ↑: aumentado; ↓: disminuido; ↓↓: muy disminuido

VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; sTfR: receptor soluble de transferrina; ZnPP: zinc protoporfirina

5.2 Marcadores de diagnóstico

Existe un gran número de biomarcadores del estado de hierro cuya alteración puede indicar una posible deficiencia de hierro. Sin embargo, no ha sido hasta 2004 cuando se ha llegado a un consenso internacional (WHO/Center for Disease Control and Prevention) acerca de qué parámetros son los más adecuados para evaluar el estado de hierro de una población y para controlar el impacto que podría tener una intervención nutricional en caso de que fuera necesario. A continuación se incluye una amplia revisión de los diferentes biomarcadores del estado de hierro, aunque según el consenso internacional, los 5 parámetros que son imprescindibles para determinar el estado de hierro de un individuo son: la hemoglobina, el volumen corpuscular medio, la zinc protoporfirina, el receptor soluble de transferrina y la ferritina sérica (WHO, 2007).

5.2.1 Índices del estado de los glóbulos rojos

5.2.1.1 Hemoglobina

La concentración de hemoglobina, expresada en gramos de hemoglobina por 100 mL de sangre total (g/dL), refleja la cantidad del principal transportador de oxígeno en sangre. Por ello es considerada como el parámetro de elección para detectar los casos de anemia. La distribución normal de hemoglobina varía con la edad, el sexo y el estado fisiológico (por ejemplo durante el embarazo). Así, se han propuesto diferentes límites de normalidad, que van de 13.0 a 14.2 g/dL en hombres y de 11.6 a 12.3 g/dL en mujeres (WHO, 2001; Beutler y Waalen, 2006). El criterio de corte de la hemoglobina también puede variar por la altitud, el tabaquismo, la etnia y la variabilidad de los análisis, por lo que habría que aplicar factores correctores en caso necesario (Zimmermann, 2008).

Sin embargo, la hemoglobina por sí sola no se considera un factor adecuado para detectar cambios en el estado de hierro o una deficiencia del mineral, por su falta de sensibilidad y especificidad. Se considera de baja sensibilidad porque se necesita perder del orden de un 20-30% del hierro del organismo para disminuir su concentración, y es poco específica porque no sólo la deficiencia de hierro causa anemia (Cook, 2005).

5.2.1.2 Hematocrito y número de hematíes

El hematocrito es el porcentaje de glóbulos rojos intactos de una muestra de sangre total, mientras que el número de hematíes es el número de glóbulos rojos contenido en un volumen específico de sangre, normalmente expresado como millones de glóbulos rojos por microlitro de sangre total (Ruiz Argüelles, 2009). Estos dos parámetros disminuyen en situaciones de deficiencia de hierro y anemia, aunque se considera que su determinación no aporta ninguna información extra sobre la anemia que no pueda ser obtenida con la medida de la concentración de hemoglobina (WHO, 2008).

5.2.1.3 Volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media

El volumen corpuscular medio (VCM) refleja el tamaño medio de los glóbulos rojos, expresado en femtolitros (fL), mientras que la hemoglobina corpuscular

media (HCM) indica la cantidad de hemoglobina por glóbulo rojo (picogramos de hemoglobina por eritrocito). En situaciones normales, los valores de HCM son generalmente paralelos a los de VCM, ya que glóbulos rojos de mayor tamaño tenderán a tener una mayor cantidad de hemoglobina. El VCM permite diferenciar las anemias causadas por deficiencias nutricionales, ya que en el caso de la anemia ferropénica tiende a disminuir (anemia microcítica) y en el caso de la anemia causada por deficiencia de vitamina B₁₂ o ácido fólico tiende a aumentar (anemia macrocítica) (Ruiz Argüelles, 2009). Sin embargo, no es un parámetro de elección en la detección de deficiencia de hierro, ya que también disminuye en casos de anemia por inflamación o talasemia (Thomas y Thomas, 2002).

5.2.1.4 Índice de distribución de hematíes

El índice de distribución de hematíes (%) refleja la variabilidad en tamaño de los glóbulos rojos y se calcula como: desviación estándar del VCM/VCM. El índice aumenta cuando hay glóbulos rojos normales y microcíticos al mismo tiempo; por ejemplo en etapas tempranas de la anemia cuando el tamaño de los eritrocitos empieza a disminuir, o al comienzo de su recuperación, cuando el tamaño de los glóbulos rojos comienza a aumentar (Dugdale, 2006).

5.2.2 Ferritina sérica

La ferritina, principal proteína de almacenamiento de hierro en las células del organismo, se secreta hacia el flujo sanguíneo en pequeñas cantidades. Esta ferritina sérica, fácilmente medible en suero, es directamente proporcional a las reservas de hierro corporal en condiciones normales: 1 ng/dL de ferritina sérica corresponde a 8-10 mg de hierro corporal o 120 µg de hierro almacenado/kg de peso. Por ello, este parámetro es uno de los más usados para el diagnóstico de la deficiencia de hierro y la anemia ferropénica, disminuyendo al producirse éstas (OMS, 2011). La OMS considera que hay una depleción de los almacenes de hierro en adultos cuando la ferritina sérica es inferior a 15 ng/dL, aunque otros autores consideran que niveles entre 15 y 30 ng/dL también son indicativos de una disminución de los almacenes del mineral (Pasricha et al., 2010).

La principal limitación de la ferritina sérica es que es una proteína de respuesta de fase aguda que aumenta en situaciones de inflamación, infección, enfermedad hepática y cáncer, de modo que en tales circunstancias no refleja la magnitud de las reservas de hierro. Debido a esto, algunos autores consideran que niveles normales o elevados de ferritina sérica no excluyen la presencia de deficiencia de hierro (Koulaouzidis et al., 2009).

5.2.3 Hierro sérico

El hierro sérico indica el hierro que está unido a la transferrina en sangre, medido en $\mu\text{g/dL}$ o $\mu\text{mol/L}$. En el contexto de la homeostasis del hierro, el hierro sérico forma parte del *pool* de hierro del organismo por un corto periodo de tiempo, unos 40-50 minutos. Esto significa que la concentración de hierro sérico cambia rápidamente por el movimiento dinámico de hierro de los tejidos, que lo pueden captar o liberar. La variabilidad individual día a día es de aproximadamente un 15%, existiendo también una variación durante el día del 10-20%. También aumenta después de las comidas, e incluso se ve afectado por el ritmo circadiano (Ridefelt et al., 2010). Aunque disminuye en los casos de deficiencia, al ser un parámetro con una alta variabilidad no se recomienda para el diagnóstico de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica (WHO, 2007).

5.2.4 Transferrina y saturación de la transferrina

La concentración de transferrina sérica (mg/dL), así como la medida de su saturación (%), son parámetros que indican el suministro de hierro a los tejidos. La concentración de la proteína transportadora de hierro aumenta durante la deficiencia de hierro, aunque puede responder a otros factores, y disminuye por ejemplo en situaciones de deficiencia proteica. Por ello, para detectar la deficiencia de hierro es recomendable calcular la saturación de la transferrina, que indica la proporción de transferrina unida a hierro (WHO, 2007).

El cálculo de la saturación de la transferrina se realiza a partir de la TIBC (*total iron binding capacity*) y el hierro sérico:

$$\text{TIBC } (\mu\text{mol/L}) = 25.1 \times \text{transferrina } (\text{g/L})$$

$$\text{Saturación de la transferrina } (\%) = \text{hierro sérico } (\mu\text{mol/L}) / \text{TIBC} \times 100$$

Estudios clínicos han demostrado que un nivel de saturación de transferrina inferior al 15% es insuficiente para cubrir los requerimientos diarios de hierro de la eritropoyesis, con lo que mantener estos niveles de transferrina durante un largo periodo de tiempo puede dar lugar a una deficiencia de hierro con afectación eritrocitaria (Huebers et al., 1987).

No obstante, el hecho de que el hierro sérico se utilice para su cálculo hace que la saturación de la transferrina sea un parámetro con alta variabilidad. Por ello, para obtener resultados fiables, se recomienda realizar su medida de forma estandarizada a la misma hora del día y en ayunas durante todo el diagnóstico (WHO, 2007).

5.2.5 Receptor soluble de transferrina

El receptor soluble de transferrina (sTfR) es un fragmento que se escinde del receptor de transferrina que está unido a la membrana de numerosos tipos de células. Los eritroblastos y los reticulocitos son los donantes predominantes de estos fragmentos en sangre, con lo que la medida de sTfR refleja la actividad eritropoyética. La concentración de sTfR (mg/L), que aumenta durante la deficiencia de hierro, parece ser un buen indicador del estado del mineral, ya que no es afectado por situaciones de inflamación o infección (Baillie et al., 2003). Sin embargo, su medida puede verse alterada por la presencia de otro tipo de anemias que disminuyen la actividad eritropoyética, como la talasemia, anemias megaloblásticas o anemia de células falciformes (Beguin, 2003). Otra limitación en su aplicación es la falta de una técnica analítica de referencia y el establecimiento de unos valores estándar a nivel internacional, por lo que la comparación directa de los resultados obtenidos en diferentes estudios es complicada (Zimmermann, 2008).

5.2.6 Zinc protoporfirina eritrocitaria

La zinc protoporfirina eritrocitaria (ZnPP) aumenta en la deficiencia de hierro porque el zinc reemplaza al mineral en la formación del anillo de protoporfirina del grupo hemo. En adultos, la ZnPP parece tener una alta sensibilidad en el diagnóstico de la deficiencia de hierro, incluso mayor que el sTfR (Metzgeroth et al., 2005). Sin embargo, su especificidad es limitada, ya que también aumenta en caso de intoxicación por plomo, anemia por inflamación o infección, o anemias hemolíticas (Labbe y Dewanji, 2004). También tiene la desventaja de que no existe consenso en su determinación y unidades de medida, aunque lo más recomendado es expresarla como la relación molar ZnPP/hemo, y el ensayo más utilizado para su determinación es la hematofluorometría de eritrocitos no lavados (Labbe et al., 1999). Se ha propuesto que niveles de ZnPP superiores a 70 $\mu\text{mol/mol}$ de hemo indican deficiencia de hierro con afectación de la eritropoyesis (Metzgeroth et al., 2005).

5.2.7 Almacenes de hierro del organismo (*Body iron*)

Esta medida es un cálculo que incluye el sTfR y la ferritina sérica, por lo que se considera una forma de reflejar el balance entre los almacenes de hierro en hígado y los requerimientos de hierro de las células. Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Body iron (mg/kg de peso)} = -[\log (\text{sTfR (mg/L)}/\text{ferritina (ng/dL)}) - 2.8229]/0.1207$$

Puede ser útil para controlar la mejora del estado de hierro en casos de una intervención, aunque su uso está limitado por la falta de estandarización del sTfR (Cook et al., 2003).

5.3 Prevalencia y grupos de riesgo

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, y es la principal causa de anemia. Según datos de la OMS, se estima que cerca de 1.000 millones de personas alrededor del mundo padecen anemia por

deficiencia de este mineral, y aproximadamente el doble sufren deficiencia de hierro (WHO, 2008).

La anemia ferropénica es multifactorial e intervienen en su desarrollo la alimentación, la etapa y la situación fisiológica, patologías asociadas y la carga genética del individuo. Es por ello que determinados grupos de población tienen un mayor riesgo de desarrollar deficiencia de hierro o, en los casos más graves, anemia ferropénica, bien por incremento de las necesidades o por aumento de las pérdidas, que no van acompañados de ingesta suficiente de hierro o cuya absorción es escasa (Vaquero, 2011).

Las mujeres en edad fértil presentan una prevalencia bastante elevada de deficiencia de hierro y anemia ferropénica debido a las pérdidas sanguíneas causadas por la menstruación, estimándose que una pérdida menstrual media de 30 mL equivale a una pérdida de 0.45 mg de hierro. Teniendo en cuenta los valores dados por la OMS para definir deficiencia de hierro y anemia ferropénica (WHO, 2001), los datos de prevalencia de deficiencia de hierro en mujeres menstruantes varían entre el 10-30% y entre el 1.5 y el 14% para anemia ferropénica en Europa (Hercberg et al., 2001), mientras que en Estados Unidos la deficiencia de hierro se encuentra en el 9.2% de las mujeres en edad fértil (Cogswell et al., 2009). En los países en vías de desarrollo, las cifras de mujeres anémicas doblan estos valores (47.5% en África, 45.7% en el Sur-Este de Asia), aunque se considera que gran parte de esta anemia se debe a otros factores diferentes a la deficiencia de hierro (Berger et al., 2011). En España no hay datos a nivel global, y aunque hay estudios a nivel regional están sesgados, por lo que no pueden utilizarse los resultados de una forma conjunta. En Andalucía se ha descrito una prevalencia de deficiencia de hierro del 14.5% y de anemia del 3% en mujeres entre 25 y 60 años, aunque al analizar por separado los datos de las mujeres menores de 45 años la prevalencia de anemia aumentó al 13.8% (Sánchez et al., 2009). En Canarias los datos existentes muestran que un 25% de las mujeres en edad fértil sufren deficiencia de hierro y un 2.9% anemia ferropénica (Henríquez-Sánchez et al., 2000); mientras que en Cataluña los estudios realizados estiman datos de deficiencia de hierro del 47.5%, pero considerándose deficientes las mujeres con valores de ferritina inferiores a 25 ng/mL (Bermejo et al., 1996).

Otros grupos de riesgo importantes son los niños y las mujeres embarazadas. Debido a las necesidades originadas por el crecimiento y la expansión eritrocitaria, la deficiencia de hierro y la anemia ferropénica son especialmente frecuentes en bebés prematuros o de bajo peso al nacer, niños y adolescentes. En niños menores de 4 años la prevalencia de deficiencia de hierro en Europa varía entre el 2 y el 30%, mientras que la de anemia está en torno al 3% (Hercberg et al., 2001). En adolescentes europeos, diferentes autores han estimado valores de deficiencia de hierro del 21% y 13.8% y de anemia ferropénica del 4.7% y 1.3% para chicas y chicos respectivamente (Ferrari et al., 2011). La elevada prevalencia en las mujeres embarazadas se debe a que durante todo el embarazo se requiere un incremento general de hierro de unos 1000 mg. Son un grupo especialmente sensible, de hecho en Europa se han descrito porcentajes del 30% de deficiencia de hierro en mujeres embarazadas que tomaban suplementos y hasta el 92% en mujeres embarazadas que no tomaban suplementos del mineral (Hercberg et al., 2001).

También existen varios subgrupos de población que pueden tener un mayor riesgo de desarrollar anemia ferropénica por su hábitos alimenticios, como los vegetarianos o las personas que siguen dietas con bajo contenido calórico, ya que su ingesta de hierro, en cantidad y calidad, puede verse comprometida. En el caso de los grupos de riesgo, como las mujeres en edad fértil, estas situaciones pueden agravar la deficiencia. En diferentes estudios en los que se ha comparado el estado de hierro de mujeres vegetarianas frente a mujeres omnívoras se ha comprobado que las vegetarianas tenían niveles de ferritina inferiores (Alexander et al., 1994; Ball et al., 1999). Otro grupo de riesgo son los deportistas con elevada actividad física, en los que se ha descrito la anemia del deportista. Ésta estaría asociada con una ingesta inferior de hierro y pérdidas elevadas del mineral por sudor (Peeling et al., 2008).

Además, determinados estados patológicos también han sido asociados con mayor presencia de anemia ferropénica. En hombres y mujeres postmenopáusicas, las pérdidas sanguíneas gastrointestinales (por úlceras sangrantes, hemorroides, fístulas, etc) son la causa más importante de deficiencia de hierro, ya que cada mililitro de sangre perdida (basado en una hemoglobina de 15 mg/L) resulta en una pérdida de aproximadamente 0.5 mg

de hierro corporal (Pasricha et al., 2010). Sin embargo, la prevalencia de deficiencia de hierro en hombres adultos europeos es muy baja, entre el 0 y el 3% (Hercberg et al., 2001). Otras patologías pueden afectar a la absorción del mineral, como enfermedades crónicas que afectan la mucosa gastrointestinal (enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, colon irritable, etc), disminución de la secreción gástrica (aclorhidria o uso abusivo de antiácidos), o procedimientos de bypass gástricos o intestinales (Goddard et al., 2000). También se ha asociado la colonización por *Helicobacter pylori* con deficiencia de hierro, tanto porque se ve afectada la absorción del mineral como por producir un aumento de las pérdidas (Hershko y Ronson, 2009).

5.4 Consecuencias para la salud

Las manifestaciones físicas más evidentes en la deficiencia de hierro incluyen fatiga, lasitud y sensación general de cansancio. En situaciones de deficiencia de hierro más severa o anemia también pueden presentarse otras manifestaciones clínicas como glositis, estomatitis angular, coiloniquia o uñas en cuchara, caída del cabello y pica (Remacha, 2011).

En niños, niveles más bajos de hierro se han relacionado con un peor desarrollo motor y cognitivo (Grantham-McGregor y Ani, 2001); mientras que en el embarazo la anemia por deficiencia de hierro está asociada con un aumento de riesgo de bajo peso al nacer, prematuridad y morbilidad y mortalidad maternal (Rasmussen, 2001).

En este apartado nos centraremos en los efectos en los adultos, principalmente en las mujeres en edad fértil, donde la deficiencia de hierro y la anemia ferropénica se han relacionado con reducción en la actividad física y la capacidad cognitiva, asociándose con un peor rendimiento laboral, y también con una menor resistencia a infecciones. Estudios recientes han relacionado también la anemia ferropénica con determinadas enfermedades, como la insuficiencia cardiaca o la osteoporosis (Pasricha et al., 2010).

5.4.1 Capacidad de trabajo físico

La relación entre la deficiencia de hierro y la capacidad de trabajo físico, medida como capacidad aeróbica, resistencia, actividad voluntaria y

productividad laboral, ha sido evaluada en diferentes estudios en humanos (Haas y Brownlie, 2001).

5.4.1.1 Capacidad aeróbica, resistencia y actividad voluntaria

El test de elección para determinar la capacidad aeróbica es la medida del consumo máximo de oxígeno ($\text{VO}_2 \text{ max}$). Los estudios realizados han demostrado que cambios en la concentración de hemoglobina están relacionados con variaciones del $\text{VO}_2 \text{ max}$, disminuyendo hasta en un 30% en mujeres con anemia ferropénica y aumentando hasta en un 24% tras 12 semanas de suplementación con hierro (Li et al., 1994). Estudios que han medido la resistencia, definida como el máximo tiempo que un individuo puede realizar una determinada carga de trabajo, han encontrado que en sujetos anémicos ésta se ve reducida hasta en un 47% (Celsing et al., 1986).

La actividad voluntaria es controlada en humanos tanto a través de cuestionarios como por la monitorización de la frecuencia cardiaca. Este tipo de actividad se refiere a la que el individuo puede realizar libremente separada de su ocupación laboral; y se dice que está afectada cuando la persona dedica más tiempo a actividades sedentarias, como dormir, que a actividades más agotadoras. Diferentes estudios han relacionado que la mejora del estado de hierro por suplementación va asociada con un aumento en la actividad voluntaria (Edgerton et al., 1979; Li et al., 1994).

5.4.1.2 Productividad económica

La influencia de la deficiencia de hierro en la productividad laboral es difícil de medir debido a la cantidad de factores confundentes que pueden existir, como la motivación de los trabajadores o el tipo de labor realizada. Por ello, los estudios existentes han sido realizados principalmente en fábricas, donde es fácil medir la productividad como la relación producción/tiempo (por ejemplo, el número de objetos fabricados/hora). Diversos estudios realizados en países en vías de desarrollo han demostrado que la suplementación con hierro a los trabajadores que padecían anemia mejoraba el cociente de productividad (Basta et al., 1979; Ohira et al., 1979; Li et al., 1994). En un análisis de 10 de estos países se calculó que el valor medio de pérdida debido a la deficiencia de hierro era aproximadamente el 0.57% del producto interior bruto (Horton y

Ross, 2003). Sin embargo, no hay estudios disponibles en países desarrollados, aunque la alta prevalencia de deficiencia de hierro en estos países hace pensar que la productividad puede verse también afectada.

5.4.2 Consecuencias neuropsicológicas

Aunque la mayor parte de los estudios de este tipo se han centrado en medir la capacidad cognitiva, también se han encontrado asociaciones interesantes entre la deficiencia de hierro y un aumento de síntomas depresivos, ansiedad e irritabilidad y una peor calidad de vida en mujeres en edad fértil (Murray-Kolb, 2011).

Respecto a la capacidad cognitiva, dos estudios observacionales realizados en mujeres en edad fértil en países desarrollados encontraron una relación entre peor estado de hierro y peor habilidad espacial, atención y memoria (Foley et al., 1986; Fordy y Benton, 1994). Estudios más recientes realizados en países en vías de desarrollo y en países desarrollados en los que se intervenía con suplementos de hierro han confirmado que la mejora del estado de hierro mejoraba la atención, la memoria, el aprendizaje y el razonamiento (Murray-Kolb y Beard, 2007; Khedr et al., 2008).

Existen diversos cuestionarios que han sido validados para determinar el impacto de la falta de hierro en la calidad de vida y en otros síntomas emocionales. Para la determinación de la calidad de vida se utiliza el cuestionario *Medical Outcome Study*, que mide tres scores, uno de componente físico, otro mental y otro de vitalidad (Murray-Kolb, 2011). Se ha observado que un peor estado de hierro se asocia con una peor calidad de vida (Patterson et al., 2000; Grondin et al., 2008). Respecto a los síntomas emocionales, la mayor parte de los estudios observacionales se han centrado en evaluar síntomas depresivos, encontrando mayor incidencia en mujeres con deficiencia de hierro (Hunt y Penland, 1999; Vahdat et al., 2007). Además, estudios intervencionales han demostrado que la mejora del estado de hierro producía una mejora de estos síntomas depresivos y de otros, como la irritabilidad y la ansiedad (Verdon et al., 2003; McClung et al., 2009).

5.4.3 Inmunidad y enfermedades infecciosas

Diversos estudios *in vitro* han observado que la deficiencia de hierro afecta a la inmunidad celular no específica, disminuyendo la capacidad bactericida de los macrófagos y el número y la actividad de los linfocitos-T (Beard, 2001). Esto podría explicar las observaciones obtenidas en estudios clínicos en los que la suplementación de hierro mejoraba la recuperación de diversas infecciones crónicas (Oppenheimer, 2001). También se ha observado en un estudio prospectivo que las complicaciones postoperatorias por infección fueron significativamente más comunes en los pacientes que presentaban bajas reservas de hierro en el preoperatorio que los que tenían reservas de hierro normales, medidas por la ferritina sérica (Harju, 1988).

5.4.4 Comorbilidad y relación con otras enfermedades

La presencia de anemia se ha relacionado con otras patologías como el riesgo cardiovascular. Aunque los mecanismos de esta asociación aún se desconocen, podría deberse a que en situaciones de deficiencia de hierro hay un incremento en el daño oxidativo y en el daño al ADN. Esta relación implica no sólo que la deficiencia crónica de hierro puede acelerar el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, sino que también es un factor de riesgo independiente de esta enfermedad (Toxqui et al., 2010). Además, se ha observado que los pacientes con insuficiencia cardíaca que presentan anemia tienen aproximadamente 1.3 veces más riesgo de mortalidad, y que el tratamiento de estos pacientes con hierro mejora los síntomas de la insuficiencia cardíaca (Carson y Adamson, 2010).

Recientemente se ha sugerido también la asociación entre deficiencia de hierro y predisposición a osteoporosis. Esta relación se ha estudiado fundamentalmente en animales, donde se ha observado que la anemia severa produce efectos deletéreos en hueso, aumentando la reabsorción y disminuyendo la formación (Katsumata et al., 2006; Parelman et al., 2006; Diaz-Castro et al., 2012). En humanos hay pocos estudios disponibles, aunque uno de ellos realizado en mujeres con osteoporosis observó que las que presentaban menores niveles de hierro tenían un mayor riesgo de fractura ósea (D'Amelio et al., 2008). Una posible explicación sería que el hierro está implicado en la formación de colágeno, ya que actúa de cofactor de las

enzimas prolil y lisil hidroxilasas (Knott y Oailey, 1998), por lo que se ha sugerido que la falta de hierro podría comprometer esta función. Además, se ha encontrado una relación interesante entre la deficiencia de hierro y la de vitamina D (McGillivray et al., 2007; Sim et al., 2010). Aunque la naturaleza de esta interacción es desconocida, parece que podría ser recíproca, ya que observaciones clínicas sugieren un posible papel de la 1,25-hidroxivitamina D, el metabolito activo de la vitamina D, en la eritropoyesis (Tanaka y Teitelbaum, 1990). Por otro lado, el hierro es imprescindible para la conversión de 25-hidroxivitamina D a 1,25-hidroxivitamina D, a través de la enzima renal 25-hidroxivitamina D 1 α -hidroxilasa, que requiere como cofactores el citocromo P-450, una ferredoxina y una ferredoxin reductasa (Jones et al., 1998).

6 Prevención y tratamiento nutricional de la deficiencia de hierro

La prevención de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica es desde hace más de una década una prioridad de la OMS (WHO, 2001) y las estrategias nutricionales deben aplicarse a los diferentes grupos de riesgo. El papel de la alimentación es fundamental en las primeras etapas de la deficiencia, ya que si se llega a la anemia ferropénica, la recuperación sólo puede realizarse a través de la farmacología (Vaquero, 2011).

6.1 Biodisponibilidad del hierro: concepto y factores que influyen

La biodisponibilidad de un componente de los alimentos se define como la proporción del mismo que se absorbe y se utiliza para las funciones normales del organismo. El hierro es un mineral cuya biodisponibilidad va a depender de múltiples factores, incluidos los factores propios del individuo y los factores dietéticos. Los factores individuales, presentados a lo largo de esta revisión, incluyen los requerimientos de hierro y la genética, lo que influirá en el estado de hierro del individuo. Respecto a los factores dietéticos, la biodisponibilidad del mineral depende de la cantidad y naturaleza del hierro de los alimentos, además de la presencia de los otros componentes de la dieta.

6.1.1 Factores dietéticos

6.1.1.1 Hierro

Como se ha indicado anteriormente, el hierro está presente en los alimentos tanto en forma inorgánica (sales férricas y ferrosas) como orgánica (hemo). El hierro hemo se encuentra exclusivamente en alimentos de origen animal, y aún en éstos su porcentaje no suele ser superior al 40% del hierro total, siendo el resto hierro no hemo (Monsen et al., 1978). Este hierro hemo tiene mayor biodisponibilidad (15-35%) ya que sigue una ruta de absorción intestinal distinta, y se absorbe prácticamente sin estar condicionado por la presencia de inhibidores y potenciadores de la absorción. Sin embargo, el hierro inorgánico o no hemo entra en un *pool* intercambiable que está sujeto a los efectos de promotores e inhibidores de la absorción, tanto exógenos como

endógenos. Por todo ello, el hierro no hemo se absorbe en menor proporción (2-20%) (Craig, 1994).

Se estima que la biodisponibilidad del hierro de una dieta occidental habitual varía entre el 5 y el 15%, y contiene aproximadamente un 10% de hierro hemo y un 90% de no hemo.

6.1.1.2 Otros componentes de los alimentos: potenciadores e inhibidores

Cuando hablamos de factores dietéticos que modifican la biodisponibilidad del hierro de la dieta, nos referimos a alimentos y componentes de los alimentos que pueden facilitar o impedir la absorción del hierro dietético, también conocidos como potenciadores e inhibidores, los cuales han sido ampliamente estudiados en los últimos 30 años.

Los potenciadores de la absorción de hierro más conocidos y potentes son el ácido ascórbico y los alimentos de origen animal. Por lo que respecta a los inhibidores, la mayoría son compuestos presentes en alimentos de origen vegetal, destacando entre ellos los fitatos presentes en la fibra, algunos polifenoles, e incluso determinados minerales, como el calcio (Hurrell y Egli, 2010).

➤ Potenciadores:

Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) es un fuerte potenciador de la absorción de hierro no hemo. Ya desde los años 80 se estableció este efecto (Lynch y Cook, 1982; Hallberg y Rossander, 1984), que se ha explicado por diversos mecanismos:

- El AA forma quelatos solubles con el hierro en el estómago, manteniendo la solubilidad del hierro no hemo cuando el alimento entra en el medio alcalino del intestino delgado, lo cual evita el efecto de los diferentes quelantes del hierro dietético como los fitatos y los polifenoles. Esto parece deberse a que el hierro forma complejos con el AA a un pH menor que el que se necesita para la formación de complejos con los polifenoles y los fitatos.
- Favorece la existencia de un medio ácido en el estómago, lo que hace más efectiva la solubilización del hierro de la dieta.

- Es cofactor del Dcytb, enzima situada en la membrana luminal del enterocito que reduce la forma Fe^{3+} del hierro a la forma Fe^{2+} , necesario para que se produzca su absorción a través del principal transportador de hierro no hemo, el DMT-1.
- También tiene actividad ferroreductora por sí mismo, aunque en menor proporción que el Dcytb.

El resultado total de estos efectos es que el hierro proveniente del *pool* no hemo forma complejos con el AA en el estómago y pasa al intestino como hierro-ascorbato, disminuyendo la posibilidad de unión con sustancias quelantes que insolubilizan el hierro y favoreciendo la presencia de Fe^{2+} , lo que potencia su absorción (Hurrell, 1984).

Diferentes estudios de absorción han sugerido que la relación molar AA:Fe del alimento es directamente proporcional a la absorción intestinal del mineral (Reddy et al et al., 2000). Además, se ha observado que el efecto potenciador del AA es superior al efecto negativo de los componentes que inhiben la absorción de hierro, como los polifenoles, los fitatos y el calcio (Stekel et al., 1986; Siegenberg et al., 1991). Sin embargo, parece ser que el efecto del AA sobre una dieta completa es menos pronunciado (Cook y Reddy, 2001). Esto puede deberse a que el cocinado, el procesado industrial y el almacenamiento prolongado puede degradar el AA contenido en los alimentos, eliminando su efecto potenciador (Teucher et al., 2004).

Carnes, pescados y aves

Está ampliamente establecido el efecto potenciador de estos alimentos sobre la absorción de hierro no hemo, especialmente por estudios realizados con comidas ricas en cereales y legumbres. Se ha observado que al añadir pequeñas cantidades (>50 g) de carne de cerdo a un plato rico en fitatos y pobre en vitamina C, la absorción de hierro no hemo aumenta significativamente (Baech et al., 2003a). También se ha visto que el aumento en la temperatura de cocinado de la carne no afecta negativamente la absorción de hierro no hemo (Baech et al., 2003b). Además, estudios realizados en mujeres con bajas reservas de hierro, han puesto de manifiesto que el consumo de pescado azul mejora la absorción de hierro no hemo procedente de legumbres, un alimento muy rico en fitatos (Navas-Carretero et al., 2008).

Sin embargo, aún se desconoce la naturaleza del componente que proporciona el efecto potenciador a las carnes, pescados y aves, así como el mecanismo de actuación. Se han sugerido diversas teorías; por un lado, es bien conocido que el consumo de carnes aumenta la secreción ácida del estómago, lo que aumentaría la solubilidad del hierro y favorecería su absorción (Bjorn-Rasmussen y Hallberg, 1979). Sin embargo, ésta no es la causa más importante de su efecto potenciador, el cual se ha atribuido a un componente presente en estos alimentos. Existen evidencias de que podría ser un componente producto de la digestión de las proteínas miofibrilares, concretamente péptidos que contengan el aminoácido cisteína, el cual puede reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} (Layrisse et al., 1984; Taylor et al., 1986), aunque no se descarta que el efecto potenciador esté asociado al conjunto de los diferentes péptidos obtenidos en la digestión por la acción de la pepsina gástrica (Storcksdieck et al., 2007). Más recientemente, estudios realizados en células Caco2 y en humanos han sugerido que la función potenciadora podría deberse a componentes no proteicos, como los glicosaminoglucanos y la L- α -glicerolfosfocolina (Huh et al., 2004; Armah et al., 2008).

➤ Inhibidores:

Fitatos

Desde la década de los 80, se planteó la hipótesis de que la fibra dietética reducía la biodisponibilidad del hierro. Estudios iniciales indicaban que este componente de la dieta interactuaba y se unía con el hierro in vitro (Fernández y Philips, 1982). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la fibra soluble no influye en su absorción (Vaquero et al., 2000), e incluso que la fibra insoluble, como el salvado de trigo, en el contexto de una dieta completa no afecta a su biodisponibilidad (Brune et al., 1992). Las conclusiones de diversos estudios y revisiones sobre el tema parecen indicar que son los fitatos de los alimentos vegetales, y no la fibra dietética, los causantes de un efecto inhibitorio más marcado de la absorción de hierro (Van Dokkum, 2003).

El ácido fítico (mioinositol hexafosfato) inhibe la absorción de hierro, ya que se une al mineral formando complejos que son insolubles en las condiciones de pH del lumen (Minihane y Rimbach, 2002). Presente en cereales, frutos secos, semillas y legumbres, se ha demostrado que su efecto negativo depende de la dosis, y comienza a muy bajas concentraciones, 2-10 mg/comida (Hallberg et

al., 1989; Hurrell et al., 1992). Por ello se recomienda que la relación molar fitato:Fe sea lo más baja posible ($<1:1$) para impedir la inhibición de la absorción de hierro en comidas que no contengan potenciadores; o $<6:1$ para comidas que contengan también carne, pescado o ácido ascórbico (Tuntawiroon et al., 1990). El mioinositol hexafosfato puede ser hidrolizado por diversos métodos de procesado de los alimentos, incluyendo el tratamiento térmico, la molienda, el remojo, la germinación o la fermentación. Esto daría lugar a inositoles fosfato de menor grado (penta-, tetra-, tri- etc.) que tienen un efecto inhibitorio menor (Hurrell, 2004). Otro factor que influye en su capacidad de inhibición es la fuente de ácido fítico, ya que normalmente se presenta en los alimentos unido a diferentes minerales divalentes o a proteínas, con lo que gran parte de estos complejos insolubles no estarían disponibles en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, la mayoría de los estudios in vivo demuestran el efecto inhibitorio de los fitatos sobre la biodisponibilidad del hierro, por lo que es muy probable que el ácido fítico pueda formar complejos di- y tetraférricos (Ellis et al., 1982; Torre et al., 1991).

Polifenoles

Los compuestos fenólicos se unen al hierro no hemo para formar complejos insolubles. Estudios in vitro han demostrado que estos compuestos, presentes fundamentalmente en el té, en el café y en determinadas verduras y especias, tienen un efecto inhibitorio de la absorción del hierro dietético, que depende de su concentración pero también del tipo de compuesto fenólico (Gillooly et al., 1983). En este sentido, los polifenoles que contienen grupos catecol, por ejemplo, las catequinas o grupos galio (como el ácido gálico), son los que tienen más afinidad de unión con el hierro y más capacidad de inhibición de su absorción (Perron y Brumaghim, 2009). En un estudio en el que se comparaba el efecto inhibitorio de varias especias, se observó que el chile (rico en ácido gálico) pero no la cúrcuma (rica en curcumina) inhibía la absorción de hierro, a pesar de que la cúrcuma contenía casi el doble de concentración de polifenoles (Tuntipopipat et al., 2006). Frente a otros alimentos que contienen la misma concentración de compuestos fenólicos, el té negro parece ser el que tiene un efecto más negativo en la absorción de hierro comparado con el té de hierbas

y el vino, debido fundamentalmente a su contenido en ácido gálico (Hurrell et al., 1999).

Se ha descrito que consumir una taza de té negro (200 mL) después de las comidas puede disminuir entre un 60-70% la absorción de hierro, frente a un 40% de disminución por consumo de una taza de café (Zijp et al., 2000). En cereales y legumbres, los polifenoles aumentan el efecto inhibitorio que ya tienen estos alimentos por su contenido de fitatos (Hurrell et al., 2003).

Calcio

El calcio es el único nutriente al que se le ha atribuido efectos negativos tanto en la absorción de hierro no hemo como en la de hierro hemo (Hallberg et al., 1991). En estudios de absorción se ha observado que este efecto depende de la dosis, existiendo una relación inversa en forma de "ese" entre la cantidad de Ca de la comida y la absorción de hierro, ya que se ha demostrado que a concentraciones de Ca de 40 a 300 mg la inhibición es lineal, mientras que por encima de 300 mg no se produce una inhibición adicional (Hallberg, 1998). En general, se asume que cantidades de 100 mg suponen una reducción de la absorción del 50% (Zijp et al., 2000). Sin embargo, esta relación Ca-Fe no ha sido observada en estudios de dieta o en intervenciones de larga duración (Bendich, 2001). En un estudio en el que se suplementó a mujeres sanas durante 6 meses con 1200 mg de Ca (400 mg de Ca en cada comida) no se observaron diferencias en el estado de hierro al compararlas con otras que no recibieron el suplemento (Minihane y Fairweather-Tait, 1998).

Por otro lado, el mecanismo de acción es desconocido. Inicialmente, se pensó que el efecto de la inhibición del Ca se producía por competición directa con el Fe durante su absorción a través de los transportadores de la membrana apical del enterocito, aunque finalmente se descartó esa opción (Wienk et al., 1996). Actualmente, estudios más recientes realizados en células Caco2 han observado que el Ca puede modificar la expresión y la funcionalidad del DMT-1 y la FPN, afectando por tanto la absorción en la membrana apical y el flujo de hierro a la circulación a través de la membrana basal (Thompson et al., 2010; Lönnerdal, 2010). Parece ser que este efecto es a corto plazo y que se podría producir una adaptación del organismo a largo plazo, lo que explicaría por qué se observa el efecto inhibitor del Ca en estudios de absorción pero no en estudios de intervención de periodos más largos (Lönnerdal, 2010).

6.1.2 Factores propios del individuo

Como se ha presentado a lo largo de esta revisión, el estado de hierro del individuo regula la absorción de hierro a nivel intestinal, por modulación de la expresión de las proteínas transportadoras DMT-1 y FPN en el enterocito y por la regulación de la síntesis de hepcidina. Este estado de hierro dependerá, además de los factores dietéticos, de factores intrínsecos del individuo, como son sus requerimientos y su genética. Diversos autores han estudiado la influencia de estos factores en las variaciones interindividuales de las reservas de hierro. En un estudio en mujeres jóvenes, se observó que el factor más importante era las pérdidas menstruales (Harvey et al., 2005), aunque no se determinó la presencia de mutaciones; mientras que en otro realizado en población de 18 a 75 años se vio que la presencia de las mutaciones del *HFE*, C282Y y H63D, era lo que más influía en el estado de hierro (Aranda et al., 2010). Un estudio en mujeres de 35 a 69 años observó que los niveles de ferritina eran más elevados en las mujeres postmenopáusicas que tenían la mutación C282Y (Cade et al., 2005).

Diversos estudios han demostrado que la relación entre el estado de hierro y la absorción intestinal es lineal y se ha llegado a explicar matemáticamente utilizando la ferritina sérica como indicador del estado de hierro (Cook et al., 1991). Otras investigaciones han apuntado que la absorción de hierro de una comida era mayor en mujeres que presentaban bajos niveles de hierro frente a las que presentaban niveles normales, independientemente de la presencia de otros componentes de los alimentos (Moretti et al., 2006; Thankachan et al., 2008), aunque se ha observado que dicha relación no existe en mujeres portadoras de determinados genotipos (Sarriá et al., 2007b).

6.2 Ingestas recomendadas de hierro

Desde 1997 se ha venido desarrollando un nuevo enfoque de las Ingestas Recomendadas, denominándose actualmente Ingestas Dietéticas de Referencia (DRI, *Dietary Reference Intakes*). Este nuevo concepto hace referencia a la cantidad de un nutriente que debe contener la dieta para prevenir las enfermedades deficitarias, reducir las enfermedades crónicas y conseguir una salud óptima. Las DRI incluyen 4 tipos de valores de referencia con aplicaciones concretas (Carbajal, 2003). En el caso del hierro, nos

centraremos en 2 de estos valores: el Requerimiento Medio Estimado (EAR, *Estimated Average Requirement*) y las Ingestas Recomendadas (RDA; *Recommended Dietary Allowances*).

El EAR es el valor de ingesta diaria media de un nutriente que cubre las necesidades del 50% de un grupo homogéneo de población sana de igual edad, sexo y con condiciones fisiológicas y de estilo de vida similares; mientras que la RDA se define como la cantidad de un nutriente que se juzga apropiada para cubrir los requerimientos de casi todas las personas (97-98%) de los grupos definidos anteriormente. La RDA de un nutriente determinado se calcula normalmente a partir de su EAR de la siguiente forma (Carbajal, 2003):

$$RDA = EAR + 2 \text{ veces la desviación estándar del EAR}$$

En el caso del hierro, la determinación del EAR y por extensión de la RDA, exigirá determinar:

- Los requerimientos para cada grupo poblacional, que se calcularán en función de las necesidades fisiológicas y de las pérdidas de hierro
- Un factor o ratio de absorción intestinal del hierro de la dieta consumida.

En el caso de las mujeres en edad fértil, el cálculo del EAR y de la RDA de hierro es bastante complejo, tanto por la metodología que requiere como por la cantidad de variables a tener en cuenta. Por ello, los valores que se presentan son muy dispares (Tabla 3) y sólo se han encontrado cuatro organismos que hayan desarrollado una metodología clara al respecto: el *Institute of Medicine* (IOM) de Estados Unidos (IOM, 2001), el conjunto FAO/OMS a nivel internacional (FAO/WHO, 2004), el *Scientific Advisory Committee on Nutrition* (SACN) en Reino Unido (SACN, 2010) y el *Scientific Committee on Food* de la Unión Europea (Scientific Committee on Food, 2003).

Tabla 3. Comparativa de cálculo del EAR y de las RDA de hierro para mujeres en edad fértil (19-50 años) entre diferentes países y organismos.

PAIS/ ORGANISMO	PÉRDIDAS BASALES (mg/día)	PÉRDIDAS MENSTRUALES (mg/día)		FACTOR ABSORCIÓN (%)	EAR (mg/día)	RDA (mg/día)	REFERENCIA
		PERCENTIL 50	PERCENTIL 95				
IOM	0.896	0.51	1.83	18	8	18	IOM, 2001
FAO/OMS	0.87	0.48	1.90	15	9.7	19.6	FAO/OMS, 2004
				12	12.1	24.5	
				10	14.6	29.4	
				5	29.2	58.8	
Reino Unido	0.86	0.45*	N.I	15	11.4	14.8	SACN, 2010
Unión Europea	0.87	0.48	1.90	15	10	20	Scientific Committee on Food, 2003

*percentil 75: N.I: no indicado

Uno de los factores a tener en cuenta para calcular los requerimientos son las pérdidas de hierro. Al igual que en hombres y mujeres postmenopáusicas, existen unas pérdidas basales producidas a través de la orina, sudor y descamación intestinal; pero las necesidades de hierro de las mujeres en edad fértil vienen determinadas fundamentalmente por las pérdidas producidas durante la menstruación. Aunque existen varios estudios que demuestran una relación entre la duración del periodo menstrual y el volumen de las pérdidas menstruales y la ferritina sérica, se considera que la distribución está sesgada (Milman et al., 1993; Harvey et al., 2005), y los distintos organismos han dado diferentes cifras de requerimientos medios.

Respecto al factor o ratio de absorción va a depender, como hemos dicho anteriormente, del estado de hierro del individuo y de los factores dietéticos. El método más preciso de determinación de la biodisponibilidad sería la aplicación de determinados algoritmos que se han desarrollado a partir de los diferentes estudios de absorción disponibles, ya que tienen en cuenta todas las variables influyentes (Hallberg y Hulthen, 2000). Sin embargo, este método es de difícil aplicación y en general se utiliza como factor un valor medio calculado a partir de la absorción de hierro de una dieta occidental observada en individuos sanos que presentan valores normales de hierro funcional pero almacenes mínimos (ferritina sérica < 15 ng/mL). Tampoco existe consenso

entre los diferentes organismos acerca de qué factor es el más representativo de la absorción media de hierro.

En España, la RDA de hierro para mujeres en edad fértil es 18 mg/día (Moreiras et al., 2011). Sin embargo, no existe consenso para este valor entre los diferentes países, existiendo grandes diferencias en las ingestas recomendadas (Cuervo et al., 2009). De hecho, actualmente se están revisando las RDA a nivel Europeo (Cavelaars et al., 2010).

6.3 Prevención nutricional de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica

Las diferentes estrategias para prevenir la deficiencia de hierro incluyen la suplementación con hierro, la modificación de los hábitos alimentarios y la inclusión de alimentos fortificados. La suplementación es eficaz y de coste aceptable en situaciones en las que se requiere un aporte extra de hierro durante un periodo de tiempo determinado, por ejemplo durante el embarazo. Sin embargo, su mayor limitación es la falta de cumplimiento por las molestias gastrointestinales que suele causar, debido a la elevada cantidad de hierro que contienen estos suplementos. Respecto a la modificación de la dieta, sería el método preferente, aunque presenta bastantes limitaciones a nivel práctico. Es difícil cambiar los hábitos dietéticos, y los alimentos que contienen el hierro más biodisponible, como por ejemplo la carne roja, son también más caros y su consumo excesivo se ha asociado con el desarrollo de determinadas enfermedades. Los alimentos fortificados parecen ser la mejor opción, aunque hay que tener en cuenta múltiples factores para favorecer al máximo la absorción de hierro, como la elección de la sal fortificante y el alimento a fortificar (Lynch, 2005). A continuación se indica con más detalle los aspectos implicados en las intervenciones dietéticas y en la utilización de alimentos funcionales.

6.3.1 Intervenciones dietéticas

La influencia de los factores dietéticos que afectan a la biodisponibilidad de hierro deben tenerse en cuenta dentro del contexto de la dieta habitual en la que se consumen (Hunt, 2005).

En general, el objetivo de las intervenciones dietéticas es mejorar el estado de hierro de diferentes grupos de población con mayor riesgo de desarrollar anemia ferropénica, a partir del aumento de la cantidad y/o de la biodisponibilidad del hierro de la dieta. Existen diferentes tipos de metodologías:

- Estudios controlados aleatorizados: Tienen como objetivo comparar las diferencias en el estado de hierro entre dos grupos de características similares que siguen tratamientos diferentes de forma paralela. Básicamente se han realizado las siguientes comparativas:
 - Dieta con peor hierro disponible frente a una dieta con mejor hierro disponible.
 - Dieta con mejor hierro disponible frente a placebo.
 - Dieta con mejor hierro disponible frente a tratamiento con suplementos.
- Estudios controlados cruzados aleatorizados: Las dos dietas que se comparan son administradas a cada sujeto en periodos sucesivos que han sido determinados aleatoriamente, lo que permite a cada sujeto ser su propio control. Este diseño tiene la ventaja de que minimiza mucho la variación debida al individuo. Sin embargo, es difícil de aplicar cuando los periodos experimentales han de ser largos, por lo que para estudiar los efectos de las intervenciones nutricionales de varios meses de duración en el estado de hierro se prefieren los ensayos controlados aleatorizados.

La tabla 4 muestra un resumen de la metodología y los resultados obtenidos en diversos estudios de intervención nutricional realizados en mujeres en edad fértil.

Tabla 4. Estudios de intervención nutricional realizados en mujeres en edad fértil

AUTOR/AÑO	TIPO DE ESTUDIO	SUJETOS	DURACIÓN	INTERVENCIÓN	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	RESULTADOS
Navas-Carretero et al., 2009a	Controlado cruzado aleatorizado, comparación 2 dietas (carne frente a pescado azul)	n= 25 Ft<30ng/ml Hb >11g/L	8 sem x 8 sem	-Dieta 1(rac/sem): 5 carne roja+2 pollo -Dieta 2(rac/sem): 2 salmón, 2 atún, 1 sardinas+ 2 pollo	Hb, Ft, SI, Tf, sTfR, ZnPP (al inicio, mitad y final)	Sin diferencias significativas. Ft tiende a aumentar y sTfR a disminuir con la Dieta 1
Tetens et al., 2007	Controlado aleatorizado, comparación 2 dietas (carne frente a restricción de alim origen animal)	n= 57 Ft<30ng/ml Hb >12g/L	20 sem	-Dieta 1(g/día): 150g carne -Dieta 2: consumían <250 g carne y <120 g pescado a la semana	Hb y Ft (inicio y final)	Sin diferencias significativas en la Dieta 1, pero la Ft disminuyó (p<0.001) con la Dieta 2.
García et al., 2003	Controlado aleatorizado, comparación de limonada rica en AA con placebo	n= 36 Ft<12ng/ml Hb >13g/L	8 meses	-Dieta: consumían con la comida 250mL de limonada (25mg AA) 2 veces/día -Placebo: La misma limonada pero sin AA	Hb, Ft, sTfR, sTfR/Ft (inicio y cada 2meses)	No se encontraron diferencias significativas entre grupos
Patterson et al., 2001	Controlado aleatorizado, comparación dieta rica en hierro frente a suplemento	n= 44 Ft<15ng/ml Hb >12g/L	12 sem	-Dieta: combinaban alimentos para absorber 2.25mg Fe/día -Suplemento:105mg Fe/día	Hb, Ft, SI, TIBC (inicio, final y 6 meses después de finalizar)	Dieta: Ft no cambió en la intervención pero aumentó después de los 6 meses (p<0.05) Suplemento: Ft aumentó (p<0.05) en la intervención pero no después de los 6 meses
Heath et al., 2001	Controlado aleatorizado con placebo, comparación 3 grupos (dieta, suplemento, placebo)	n= 75 Ft<20ng/ml Hb >12g/L	16 sem	-Suplemento:50 mg Fe/día -Dieta: pautas para potenciar absorción Fe + 250mL zumo /día con la comida -Placebo	Hb, Ft, sTfR, sTfR/Ft (inicio y cada 4 semanas)	Ft aumentó y sTfR disminuyó en el grupo de suplemento en comparación con placebo (p<0.001); con dieta similar tendencia pero no es significativo.

Ft: ferritina, Hb: hemoglobina, SI: hierro sérico, Tf: transferrina, sTfR: receptor soluble de transferrina, ZnPP: zinc protoporfirina, sem: semanas, AA: ácido ascórbico, rac/sem: raciones/semana

6.3.2 Alimentos fortificados

Los alimentos fortificados con hierro han sido recomendados como una de las estrategias preferentes para la prevención y la erradicación de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica. Sin embargo, la fortificación de alimentos con hierro es uno de los procesos que sigue constituyendo un reto para la industria alimentaria, ya que la elección del tipo y de la cantidad de la sal fortificante y del alimento matriz es fundamental para evitar problemas, tanto en la aceptación y la vida media del producto como en la eficacia del alimento en la mejora del estado de hierro.

Respecto a las sales de hierro, las dos características fundamentales a tener en cuenta son la biodisponibilidad relativa de la sal y los posibles efectos adversos que pueden provocar los diferentes compuestos de hierro utilizados

sobre la apariencia y las propiedades organolépticas del alimento. La biodisponibilidad relativa va a depender enormemente de la solubilidad de los compuestos de hierro en el jugo gástrico durante la digestión. Según eso, se pueden dividir en tres categorías (Mehansho, 2006):

- Compuestos altamente solubles en agua, que se disuelven en ácido casi instantáneamente y presentan la mayor biodisponibilidad relativa.
- Compuestos solubles en ácido, que se disuelven casi completamente pero de forma más lenta.
- Compuestos insolubles en agua y poco solubles en ácido, que nunca se disuelven totalmente en ácidos diluidos por lo que su biodisponibilidad relativa es altamente variable.

Los cambios organolépticos que las sales de hierro pueden causar son:

- Sabor y/o regusto metálico.
- Sabor a rancio como resultado de la oxidación de las grasas.
- Cambios de color resultado de las interacciones con antocianos, flavonoides y taninos.
- Degradación de vitaminas (por ejemplo, vitaminas C y A; que además son importantes para la absorción de hierro) y minerales (por ejemplo oxidación de iodo).

Desgraciadamente, las sales con mayor biodisponibilidad son las que mayores cambios organolépticos producen en los alimentos. Por ello, el desarrollo de nuevas tecnologías para evitar la aparición de efectos sensoriales adversos sin comprometer la elevada biodisponibilidad del hierro es un tema de actualidad. La encapsulación de compuestos de hierro parece ser una buena opción, aunque tanto la composición del material como el grosor de la cápsula influyen de manera importante en la biodisponibilidad del hierro. Se ha propuesto que una relación cápsula/substrato de 40:60 es la mejor opción para no incidir negativamente en la biodisponibilidad del hierro del compuesto encapsulado (Wegmüller et al., 2004). Respecto al material, se ha observado que para una misma cantidad de hierro, una cubierta de mono y di-glicéridos o de aceite de soja parcialmente hidrogenado supone una mayor biodisponibilidad relativa

que una cubierta de maltodextrina o de aceite de palma parcialmente hidrogenado (Zimmermann y Windhab, 2010). También el tamaño de partícula influye en la biodisponibilidad relativa de hierro, de modo que una reducción del tamaño de 2.5 a 0.5 μm incrementa la biodisponibilidad relativa del pirofosfato férrico hasta el 95% (Wegmüller et al., 2004). Los quelatos de hierro también son otra opción; fundamentalmente hay dos tipos: el biscalcinato ferroso y el NaFeEDTA. El primero está formado por dos moléculas de glicina que se combinan con hierro ferroso en una estructura de anillo. El hierro es protegido de los inhibidores por la estructura, y se ha comprobado que su absorción es 3.5 veces mayor que la del sulfato ferroso al añadirlo a alimentos ricos en fitatos y calcio (Hertrampf y Olivares, 2004). Las evidencias sugieren que el NaFeEDTA es un fortificante muy efectivo, aumentando la absorción de sulfato ferroso de 2 a 4 veces en alimentos que contienen inhibidores, y causando menores problemas organolépticos (Bothwell y MacPhail, 2004). La principal desventaja de estos nuevos fortificantes de hierro es su elevado precio comparado con las sales tradicionales.

Respecto a los alimentos candidatos a ser fortificados, hay que tener en cuenta que no todas las sales de hierro son apropiadas para cualquier alimento, y que recomendar su uso dependerá de si los alimentos son sólidos o líquidos, o de si tienen una mayor o menor cantidad de péptidos, fitatos o carbohidratos (Hurrell, 2007). En la tabla 5 se presenta un resumen de las diferentes sales de hierro, con su biodisponibilidad relativa, cambios organolépticos causados y alimentos con los que se utilizan.

Por último, otra cuestión muy importante es que la matriz a fortificar sea neutra o contenga compuestos que favorezcan la absorción de hierro; ya que si contiene compuestos inhibidores, como fitatos o polifenoles, reducirá en gran parte la eficacia del alimento fortificado (Moretti et al., 2006). Estudios en animales de experimentación han demostrado que la misma cantidad de pirofosfato férrico encapsulado micronizado presenta una mejor absorción y utilización de hierro en los tejidos cuando el alimento fortificado es un paté, que contienen potenciadores de la absorción de hierro (Navas-Carretero et al., 2007a) comparado con cacao, rico en polifenoles que inhiben la absorción (Navas-Carretero et al., 2007b).

Tabla 5. Características de las diferentes sales de hierro (Modificado de Hurrell, 2002)

COMPUESTO DE HIERRO	CONTENIDO DE HIERRO (%)	BIODISPONIBILIDAD RELATIVA		PROBABILIDAD DE CAMBIOS ORGANOLÉPTICOS	ALIMENTOS
		Ratas	Humanos		
Compuestos altamente solubles en agua					
Sulfato ferroso heptahidrato	20	100	100	Elevada	Salsa de soja o pescado
Sulfato ferroso anhidro	33	100	100		Harina blanca de trigo, harina de maíz sin germen, pasta, leche en polvo, alimentos infantiles
Lactato ferroso	19	---	106		Zumos, refrescos
Citrato férrico de amonio	18	107	---		Leche
Compuestos poco solubles en agua/Solubles en ácido diluido					
Fumarato ferroso	33	95	100	Baja	Harina blanca de trigo, harina de maíz sin germen, harina integral de trigo, harina de maíz, chocolate, alimentos infantiles
Succinato ferroso	35	119	92		Harina blanca de trigo, harina de maíz sin germen, harina integral de trigo, harina de maíz, chocolate, alimentos infantiles
Insolubles en agua/Poco solubles en ácido diluido					
Pirofosfato férrico	25	45-48	21-74	Casi nula	Arroz, chocolate, sal
Ortofosfato férrico	28	6-46	25-32		Cereales de desayuno
Hierro elemental en polvo					
Electrolítico	97	16-70	75		Harina blanca de trigo, harina de maíz sin germen, cereales de desayuno, alimentos infantiles
Carbonilo	99	35-66	5-20		Harina blanca de trigo, harina de maíz sin germen
Compuestos encapsulados (relación cubierta:substrato, material de la cubierta)					
Pirofosfato férrico encapsulado micronizado (0.5µm) (60:40, aceite de palma y lecitina)	20	95	---	Casi nula	Leche, zumos, refrescos, cubos de caldo
Fumarato férrico encapsulado (40:60; aceite de ricino)	20	111	---		Harina blanca de trigo, harina de maíz sin germen, harina integral de trigo, harina de maíz
Sulfato férrico encapsulado (40:60; mono- y diglicéridos)	20	116	---		Harina blanca de trigo, harina de maíz sin germen, harina integral de trigo, harina de maíz, sal
Compuestos quelantes					
Bisciglinato ferroso	20	---	90-350	Casi nula	Leche, zumos, refrescos
NaFeEDTA	13	---	200-400		Harina integral de trigo, harina de maíz, alimentos infantiles, salsa de soja, azúcar

Existen 3 categorías de fortificación definidas por la WHO/FAO en su Guía de Fortificación de Alimentos con Micronutrientes (2006):

- Fortificación en masa (*mass fortification*): Se define como la adición de micronutrientes a alimentos básicos de amplio consumo como harinas o productos derivados, condimentos o leche.
- Fortificación dirigida (*target fortification*): Diseñada para cubrir las necesidades de grupos específicos, por ejemplo, la fortificación de alimentos infantiles para mejorar el estado nutricional de los niños.
- Fortificación realizada por los fabricantes (*open-market fortification*): Adición de micronutrientes a determinados alimentos, por ejemplo los cereales de desayuno, con el fin de mejorar no sólo la salud de los consumidores sino también para aumentar la rentabilidad del producto.

La fortificación en masa ha jugado un papel muy importante en la reducción de la prevalencia de la deficiencia de hierro en los países desarrollados en los últimos 50 años del siglo XX. La fortificación de harinas y productos derivados ha sido obligatoria en Estados Unidos, Canadá y algunos países europeos, como Suecia, Dinamarca y Finlandia hasta los años 90, cuando se eliminó por el incremento de la prevalencia de hemocromatosis (Ramakrishnan y Yip, 2002). Sin embargo, un estudio prospectivo realizado en Suecia (de 1996 a 2002), donde la fortificación de la harina fue obligatoria hasta 1994, mostró que la ingesta de hierro en mujeres jóvenes disminuyó un 39% y la deficiencia de hierro aumentó del 39 al 50% al finalizar el periodo de fortificación obligatorio (Hallberg et al., 2002).

En la mayoría de los países en vías de desarrollo la fortificación en masa de determinados productos básicos es obligatoria, aunque no están obteniendo los resultados esperados. Una revisión bastante reciente sobre el tema muestra que tan sólo en 9 de 78 países en los que se fortifica la harina con hierro de forma obligatoria, se ha encontrado un impacto positivo en el estado de hierro de la población. En algunos casos, la media per cápita de consumo de harina o la adición de hierro es muy baja, pero la mayor causa de esta falta de efecto sobre el estado de hierro es la baja biodisponibilidad de los compuestos y el efecto inhibitorio de las matrices utilizadas (Hurrell et al., 2010).

Todo ello ha puesto de manifiesto la necesidad de mejora de los programas de fortificación, y se espera que los mayores avances se obtengan en la próxima década. Últimamente, se están realizando enfoques más innovadores para superar las dificultades tecnológicas de la fortificación con hierro, como el uso de NaFeEDTA en alimentos sólidos o el encapsulado de diferentes sales para mejorar la solubilidad en productos líquidos. En los países en vías de desarrollo se están proponiendo nuevos alimentos diana candidatos a la fortificación en masa que no contengan inhibidores de la absorción de hierro, como la sal, las salsas de soja y de pescado o el curry (Lynch, 2011). Otra opción que se plantea es la mejora de la biodisponibilidad de hierro a través de la adición de potenciadores de la absorción a los alimentos fortificados, especialmente ácido ascórbico (Lynch y Stoltzfus, 2003). Por otro lado, en los países desarrollados donde conviven grupos con riesgo de desarrollar anemia ferropénica junto con otros grupos propensos a desarrollar hemocromatosis, la fortificación dirigida se hace imprescindible para evitar problemas de salud pública.

En la tabla 6 se muestra un resumen de recientes intervenciones con alimentos fortificados realizadas en mujeres en edad fértil, que reflejan estos nuevos enfoques.

Tabla 6. Estudios de intervención con alimentos fortificados en mujeres en edad fértil

AUTOR/ AÑO	TIPO DE ESTUDIO	SUJETOS	DURACIÓN	ALIMENTO/ SAL DE HIERRO	INTERVENCIÓN	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	RESULTADOS
Beck et al., 2011	Ensayo de intervención aleatorizado controlado, 2 grupos paralelos	n= 69 Ft <25ng/ml Hb >11.5g/L	16 sem	Cereales de desayuno/ Sulfato ferroso	-Grupo 1: cereales de desayuno (16 mg Fe/día)+ kiwi -Grupo 2: cereales de desayuno (16 mg Fe/día)+ plátano	Hb, Ft, sTfR, (al inicio y final)	Ft aumentó (p<0.001) y sTfR disminuyó (p=0.001) en el grupo 1 respecto al grupo 2
Karl et al., 2010	Ensayo de intervención aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo	n= 124 Ft=45ng/ml Hb=11.9g/L	9 sem	Barra de cereales/ Sulfato ferroso	-Grupo 1: 2barras de cereales fortificada (56 mg Fe/día) -Grupo 2: 2barras de cereales placebo (3.2 mg Fe/día)	Hb, RDW, Ft, TS, sTfR (inicio y final)	Hb aumentó (p<0.05) en el grupo 1 frente al 2, sin diferencias en el resto de los parámetros
Biebinger et al., 2009	Ensayo de intervención aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo	n= 279 Ft<25ng/ml Hb >12g/L	22 sem (5 días/sem)	-Galleta 1/ Fe reducido con H ⁺ -Galleta 2 /Sulfato ferroso encapsulado	-Grupo 1: galleta 1 (20 mg Fe/día) -Grupo 2: galleta 2 (10 mg Fe/día) -Grupo 3: galleta placebo (0.35 mg Fe/día)	Hb, Ft, sTfR, body iron (inicio y final)	Ft y body iron aumentaron (p<0.001) en el grupo 2 frente al placebo; sin cambios en el grupo 1.
Hotz et al., 2008	Ensayo de intervención aleatorizado, ciego, controlado por placebo	n= 145 Ft=18ng/ml Hb: 10.5-13.5 g/L	6 meses (5 días/sem)	Arroz/ Pirofosfato férrico encapsulado micronizado	-Grupo 1: 56 g de arroz fortificado (13 mg Fe/día) - Grupo 2: 56 g de arroz placebo	Hb, Ft, sTfR, body iron (inicio y final)	Ft y body iron aumentaron (p=0.02 y p=0.006); y sTfR disminuyó (p=0,02) en el grupo 1 frente al placebo
Van Thuy et al., 2005	Ensayo de intervención aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo	n= 389 Ft=27ng/ml Hb=12.5g/L	18 meses	Salsa de pescado/ NaFeEDTA	-Grupo1: 15 mL de salsa de pescado fortificada (7.5 mg Fe/día) -Grupo 2: 15 mL de salsa de pescado placebo	Hb y Ft (inicio y cada 4 meses)	Hb y Ft aumentaron (p=0.04 y p<0.001) en el grupo 1 frente al placebo.
Zimmermann et al., 2005	Ensayo de intervención aleatorizado, controlado, 4 grupos paralelos	n= 216 Ft=12ng/ml Hb= 12.3g/L	35 sem (6 días/sem)	-Snack 1/ Sulfato ferroso -Snack 2/Fe electrolítico -Snack 3/Fe reducido con H ⁺	-Grupo 1: snack 1 (10-12 mg Fe/día) -Grupo 2: snack 2 (10 -12 mg Fe/día) -Grupo 3: snack 3 (10 -12 mg Fe/día) -Grupo 4: snack placebo	Hb, Ft, sTfR, body iron (inicio, 20 sem y final)	Los 3 grupos aumentaron el <i>body iron</i> respecto al placebo (p<0.01). La eficacia del Fe electrolítico y el Fe reducido fue 77% y 49% más alta comparada con el sulfato ferroso

Ft: ferritina , Hb: hemoglobina , Tf: transferrina , TS: saturación de transferrina , sTfR: receptor soluble de transferrina, RDW: índice de distribución de hematias, sem: semanas

6.3.3 Nuevas perspectivas: Genómica nutricional

Desde hace décadas se conoce que existe diferente respuesta entre individuos a una misma dieta. Actualmente, los mecanismos de acción no son bien conocidos, si bien desde finales de los años 80 se comenzó a hipotetizar que podía ser por la modulación genética (Holtzman, 1988). Los nuevos conocimientos derivados de la secuenciación del genoma humano y las nuevas tecnologías desarrolladas han posibilitado la integración de la Genómica en la Nutrición clásica, dando lugar al auge de una nueva disciplina, la Genómica

nutricional o Nutrición molecular (Ordovás y Corella, 2004). Dentro de ésta se englobarían dos términos: la nutrigenética y la nutrigenómica. La nutrigenética se centra en el estudio de la diferente respuesta fenotípica frente a la dieta, mientras que la nutrigenómica estudia el efecto de los nutrientes sobre el genoma, el proteoma y el metaboloma (Costa et al., 2010). Esta interacción dieta-gen renueva el concepto de la denominada nutrición personalizada, y en un futuro podríamos pasar de las existentes recomendaciones nutricionales para subgrupos de población (separados por género, edad y situación fisiológica) a recomendaciones nutricionales que tengan en cuenta también el posible riesgo-beneficio asociado a nuestro bagaje genético (Joost et al., 2007).

Respecto al metabolismo del hierro, existen pocos estudios sobre la interacción dieta-gen, especialmente en población con deficiencia de hierro. Mediante estudios postprandiales para conocer la influencia de las mutaciones asociadas con la sobrecarga sobre la absorción, se ha observado que los individuos que presentan las mutaciones C282Y y el H63D del gen *HFE* absorben mayores cantidades de hierro que los que presentan el genotipo normal, y que esta absorción es similar en los sujetos que tienen anemia ferropénica (Hutchinson et al., 2008). En mujeres con deficiencia de hierro, el estudio de la presencia de la mutación G277S del gen *Tf* sobre la absorción de hierro muestra que esta absorción se incrementa de forma similar en mujeres con deficiencia de hierro que presentan la mutación frente a las del genotipo habitual, al ingerir un alimento estimulante de la absorción de hierro (Sarriá et al., 2007b).

Este campo de investigación abre una nueva perspectiva en la prevención nutricional de la deficiencia de hierro y la nutrición personalizada, por lo que es imprescindible profundizar en estos conocimientos a través de nuevas investigaciones.

**RESUMEN DE LOS ESTUDIOS
REALIZADOS Y DE LA
METODOLOGÍA EMPLEADA**

Para la realización de esta Tesis Doctoral se llevó a cabo un estudio de asociación entre diferentes variantes genéticas y parámetros del metabolismo del hierro en mujeres en edad fértil, y posteriormente se realizó un estudio de expresión de la variante genética más relevante. Además, se realizó la valoración de la ingesta habitual de alimentos, energía y nutrientes de este grupo de mujeres y se estimaron sus pérdidas menstruales, relacionándose todo ello con su estado de hierro. Por último, se estudió el efecto del consumo, como parte de la dieta habitual, de un zumo fortificado con hierro frente a un zumo sin fortificar (placebo) sobre el metabolismo de hierro y el remodelado óseo en este grupo poblacional con riesgo de anemia ferropénica.

Todos los estudios presentados en esta Tesis Doctoral fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Puerta de Hierro (Majadahonda, Madrid) y por el Comité Ético de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid).

La intervención nutricional con el zumo fortificado con hierro fue registrada en ClinicalTrials.gov con el número NCT01135576.

A continuación se presentan los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral y un resumen de la metodología empleada.

1 Estudios realizados

En base a los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo los siguientes estudios:

Estudio 1. Estudio de asociación entre variantes genéticas y parámetros del metabolismo del hierro.

Publicación: Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, López-Parra AM, Pérez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, Buil A, Arroyo-Pardo E, Soria JM, Vaquero MP. *Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women.* Nutr Metab (2011), 8:69-76 (open access).

Estudio 2. Estudio in vitro de la expresión del gen de la transferrina en función de los diferentes alelos del SNP rs3811647.

Publicación: Blanco-Rojo R, Bayele HK, López-Parra AM, Pérez-Granados AM, Baeza-Richer C, Arroyo-Pardo E, Srai SK, Vaquero MP. *Intronic SNP rs3811647 of the human transferrin gene modulates its expression in hepatoma cells.* Biochem Biophys Res Commun (2012), enviado.

Estudio 3. Valoración de la dieta en un grupo de mujeres en edad fértil y asociación con su estado de hierro.

Publicación: Blanco-Rojo R, Toxqui L, Wright I, Pérez-Granados AM, Vaquero MP. *Red meat but not white or processed meat intake is associated with increased iron stores in menstruating Spanish women.* Nutrition (2012), en trámite.

Estudio 4. Valoración de la eficacia de un zumo fortificado con hierro en un grupo de mujeres con deficiencia de hierro: ensayo de intervención nutricional, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo.

Publicación: Blanco-Rojo R, Pérez-Granados AM, Toxqui L, González-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP. *Efficacy of a microencapsulated iron*

pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. Br J Nutr (2011), 105(11):1652-9.

Estudio 5. Determinación del estado de vitamina D y marcadores del remodelado óseo en mujeres con deficiencia de hierro; y valoración de cambios en estos marcadores asociados al consumo de un zumo fortificado con hierro.

Publicación: Blanco-Rojo R, Pérez-Granados AM, Toxqui L, Zazo P, de la Piedra C, Vaquero MP. *Relationship between vitamin D deficiency, bone remodelling and iron status in iron-deficient young women consuming an iron fortified food.* Eur J Nutr (2012), en prensa. (DOI: 10.1007/s00394-012-0375-8).

Estudio 6. Asociación entre la presencia del SNP rs3811647 y la respuesta a la ingesta de un alimento fortificado con hierro en mujeres con deficiencia de hierro.

Estudio 7. Determinación de las pérdidas menstruales y del uso de anticonceptivos hormonales en un grupo de mujeres en edad fértil y asociación con su estado de hierro.

Estudio 8. Relación entre la presencia del SNP rs3811647, el uso de anticonceptivos hormonales y la ingesta de hierro hemo y los parámetros del estado de hierro en mujeres con deficiencia de hierro.

2 Resumen de la metodología empleada

2.1 Sujetos

Las voluntarias reclutadas para todos los estudios fueron mujeres con edades comprendidas entre los 18 y los 40 años, caucásicas, no fumadoras, no embarazadas, ni madres lactantes. Los criterios de exclusión fueron: amenorrea, menopausia o padecer cualquier enfermedad que pudiera afectar el estado de hierro, incluyendo talasemia, hemocromatosis, enfermedades gástricas crónicas (enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn úlceras sangrantes o colon irritable) o enfermedad renal. Además, las mujeres tampoco podían haber donado sangre o haber consumido suplementos de hierro en los 4 meses anteriores a los estudios.

Además, se añadió como criterio de exclusión anemia ferropénica en el reclutamiento de voluntarias para la intervención nutricional. Así, para los estudios 4, 5, 6 y 7 se reclutaron mujeres menstruantes, de entre 18 y 35 años, que debían presentar deficiencia de hierro, definida como hemoglobina ≥ 11 g/dL y ferritina < 40 ng/mL. También fueron excluidas si tenían alergia a algún componente de los zumos fortificados.

Las voluntarias fueron reclutadas mediante diferentes anuncios en diversos campus universitarios de Madrid (Complutense, Autónoma, Politécnica, CEU San Pablo) y a través de páginas web (www.genutren.es). Además, se realizó la difusión verbal de los estudios en diferentes actos públicos.

Todas las voluntarias recibieron información sobre el estudio en el que iban a participar, leyeron la hoja de información a la voluntaria y firmaron un consentimiento aceptando su participación en el mismo.

2.2 Recogida de muestras

2.2.1 Recogida de sangre y orina

Las muestras de sangre fueron recogidas por venopunción entre las 8:00 y las 8:30 de la mañana tras 12 horas de ayuno. El suero y el plasma se obtuvieron por centrifugación (15 minutos a 1000 g) y se almacenaron posteriormente a -80°C . Las voluntarias fueron instruidas para recoger la orina de las 24 horas

anteriores al día del análisis, comenzando el día anterior con la recogida de la segunda orina de la mañana y finalizando en el día de la analítica con la primera orina de la mañana.

2.2.2 Parámetros hematológicos y bioquímicos del estado del hierro

En sangre total o suero se determinaron los siguientes parámetros del estado de hierro: hemoglobina (Hb), hematocrito, número total de hematíes, volumen corpuscular medio (VCM), índice de distribución de hematíes, hierro sérico, ferritina sérica (Ft), transferrina sérica (Tf), saturación de la transferrina, receptor soluble de la transferrina (sTfR), zinc-protoporfirina (ZnPP) y los almacenes totales de hierro del organismo o *body iron*.

La Hb, el hematocrito, el número total de hematíes, el VCM, el índice de distribución de hematíes, el hierro sérico, la Ft y la Tf fueron determinados siguiendo técnicas estándar de laboratorio usando un auto-analizador. La ZnPP se analizó mediante hematofluorometría. La saturación de la transferrina se calculó como: $\text{hierro sérico } (\mu\text{mol/L}) / (25.1 \times \text{Tf (g/L)}) \times 100$. El sTfR fue analizado por enzimo-inmuno-ensayo (ELISA). El *body iron* se calculó como: $-\left[\log (\text{sTfR (mg/L)} / \text{ferritina (ng/dL)}) - 2.8229\right] / 0.1207$.

2.2.3 Parámetros del metabolismo lipídico, metabolismo de la glucosa y marcadores de inflamación

En suero se realizó la determinación del colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos y glucosa mediante técnicas automatizadas; y se calcularon los índices de riesgo cardiovascular: colesterol total/HDL y LDL/HDL.

Como marcador de inflamación se eligió la proteína C reactiva, que se determinó por ELISA. Se utilizó para descartar que valores elevados de ferritina (proteína de fase aguda) se debieran a fenómenos inflamatorios.

2.2.4 Determinaciones específicas sobre el estado de la vitamina D y el metabolismo óseo

Se determinó en suero la concentración de 25-hidroxivitamina D, la paratohormona (PTH) y el marcador bioquímico de formación ósea, y en orina de 24 horas el marcador de resorción ósea.

La concentración de 25-hidroxivitamina D en suero, marcador del estado de vitamina D, se determinó mediante ELISA. La PTH se analizó por quimioluminiscencia. Como marcador de formación ósea se eligió la isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (ALP) en suero, la cual se determinó por ELISA. El marcador de resorción ósea, telopéptido N terminal de colágeno tipo I (NTx), se midió en la orina de 24 horas también mediante una técnica de ELISA.

2.3 Identificación de factores de riesgo genéticos asociados a fenotipos de deficiencia de hierro y anemia ferropénica

El diseño y la metodología referente al estudio 1 ha sido publicada por nuestro grupo de investigación recientemente (Bertoncini et al., 2011). A continuación se presenta un resumen de los procedimientos empleados.

2.3.1 Selección de SNPs

Se seleccionaron 10 SNPs de la bibliografía que habían sido relacionados con el metabolismo del hierro y que eran polimórficos para población europea, con un MAF (*minor allele frequency*) superior a 0.01.

2.3.2 Extracción de ADN

Un grupo de 270 voluntarias participó en el estudio. El ADN fue extraído de las muestras de sangre mediante la técnica estándar de fenol-cloroformo con proteinasa K. Las muestras de ADN fueron cuantificadas posteriormente con un Nanodrop para conocer si la cantidad y la calidad del ADN extraído eran las suficientes.

2.3.3 Genotipado de las muestras

El genotipado de las muestras fue realizado a través de una técnica multiplex de minisequenciación (SNaPshot), que permitió detectar los 10 SNPs de manera simultánea a través de electroforesis capilar. Para comprobar que las mutaciones identificadas eran correctas, se secuenciaron una serie de muestras elegidas al azar.

2.4 Estudio de la expresión del gen de la transferrina en función de los diferentes alelos del SNP rs3811647.

Para determinar si el SNP rs3811647 tenía algún efecto a nivel transcripcional en el gen de la transferrina se realizó un experimento in vitro en hepatocitos. Este estudio se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la *University College of London*, en Londres, Reino Unido, y supuso el desarrollo de las siguientes técnicas:

2.4.1 Construcción de plásmidos y realización de mutagénesis dirigida (*site-directed mutagenesis*)

Se insertó el fragmento que contenía la variante mutada del SNP (intrón 11 del gen de la *Tf*) en un vector pGEM-T, obteniéndose la construcción *VarA-TF-luc*. Posteriormente, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida del mismo para obtener la variante normal del SNP, obteniéndose la construcción *VarG-TF-luc*.

2.4.2 Cultivo celular, transfección y ensayo de la luciferasa

El cultivo de células Hep3B se realizó bajo condiciones estándar de crecimiento. Las células fueron co-transfectadas con las dos construcciones previamente obtenidas (*VarA-TF-luc* y *VarG-TF-luc*), y a las 48 horas se midió la luminiscencia mediante el ensayo de la luciferasa.

2.5 Valoración de la dieta

La valoración de la dieta de las voluntarias fue realizada mediante un registro de 72 horas previamente validado (de Groot et al., 1996; Navas-Carretero et al., 2009b). El registro tenía que ser rellenado durante 3 días consecutivos, incluyendo un festivo. Las voluntarias fueron instruidas para apuntar de forma detallada todos los alimentos y bebidas que consumieron esos días, indicando el momento del día (desayuno, media mañana, almuerzo, merienda, cena o resopón), el peso aproximado o medidas caseras de las raciones, así como los ingredientes de los platos elaborados. El cálculo de la ingesta diaria de alimentos, energía y macro y micronutrientes de la dieta se efectuó a través de un programa de valoración de dieta basado en las Tablas de Composición de Alimentos (Moreiras et al., 2011). La cantidad de hierro hemo de la dieta se

calculó según el criterio de Monsen et al. (1978), teniendo en cuenta que está presente exclusivamente en alimentos de origen animal, en un porcentaje que representa el 40% del hierro total, siendo el resto hierro no hemo.

2.6 Medidas antropométricas, determinación de la presión arterial y de la actividad física, y cuestionarios sobre salud general

Las medidas antropométricas se tomaron mediante procedimientos estandarizados. Se midió el peso, la altura y el perímetro de cintura y se calculó el índice de masa corporal (IMC), peso/talla^2 (kg/m^2). La presión arterial sistólica y diastólica se midió mediante un tensiómetro digital automático validado. Para evitar variaciones inter-ensayo, la misma persona del equipo investigador, correctamente entrenada, se encargó de tomar las medidas antropométricas y la tensión arterial de todas las participantes de cada ensayo realizado.

La actividad física se determinó mediante un cuestionario validado, el cual fue completado mediante una entrevista personal. Se preguntó a las voluntarias acerca de su actividad durante 24 horas (ocupación laboral, actividad física, tiempo y velocidad al caminar, tiempo de descanso, horas de sueño, etc), multiplicándose los minutos dedicados a cada actividad por un factor que dependía de la intensidad de la misma. De esta manera, se obtuvo un factor medio, que categorizaba la actividad física de las voluntarias como muy ligera, ligera, normal, moderada y fuerte.

Las voluntarias también rellenaron un cuestionario de salud general, para conocer si tenían antecedentes en su familia de anemia ferropénica, hipertensión, hipercolesterolemia, hipo o hipertiroidismo, osteoporosis o enfermedad renal; y también para conocer si padecían algún tipo de enfermedad o tomaban algún medicamento.

2.7 Valoración de las pérdidas menstruales

La valoración de las pérdidas menstruales se realizó mediante cuestionario. Se preguntó a las voluntarias la edad de la menarquia, si utilizaban anticonceptivos hormonales, y si su ciclo era regular o no. Además, se les pidió que anotaran la duración de la menstruación, los días de más intensidad

y el número de compresas o tampones que utilizaban en el día de mayor intensidad.

2.8 Diseño y realización de la intervención nutricional con un zumo fortificado con hierro

La intervención nutricional consistió en un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo de 16 semanas de duración. Para conocer el tamaño muestral necesario se tuvo en cuenta el parámetro ferritina. Se calculó que para un valor medio en población deficiente de 11 ± 5 ng/dL y una diferencia significativa entre tratamientos del 20%, con un poder estadístico de 0.80 y $\alpha=0.05$, se necesitarían 59 voluntarias por grupo.

Las 122 voluntarias reclutadas fueron divididas al azar en dos grupos. Un grupo consumió, como parte de su dieta habitual, 500 mL de un zumo fortificado (grupo F, $n=64$); mientras que el otro grupo consumió 500 mL de un zumo placebo (grupo P, $n=58$). Los zumos. También fortificados con vitamina C, fueron fabricados en dos sabores, naranja y melocotón-manzana para favorecer el cumplimiento. La composición de los mismos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de los zumos fortificados y de los zumos placebos utilizados en la intervención nutricional

	ZUMO FORTIFICADO		ZUMO PLACEBO	
	Naranja	Melocotón-manzana	Naranja	Melocotón-manzana
Energía (Kcal)	45	48	45	48
Proteínas (g)	0.6	0.5	0.6	0.5
Carbohidratos (g)	10.5	11.3	10.5	11.3
Lípidos (g)	0.1	0.1	0.1	0.1
Vitamina C (mg)	19	19	19	19
Hierro (mg)	3.6	3.6	0.084	0.136

Composición por 100 mL

El zumo fortificado aportaba 18 mg de hierro por ración diaria (envase de 500 mL), que corresponde al 100% de las RDA para mujeres en edad fértil en España, en forma de pirofosfato férrico micro-encapsulado con lecitina de girasol.

Las voluntarias fueron instruidas para tomar los dos sabores de forma alterna (un día el de naranja, al día siguiente el de melocotón-manzana). Tenían que consumir el zumo separado de las comidas (al menos 2 horas antes o después) y agitarlo antes de beberlo. Se utilizó un cuestionario específico para valorar la adherencia al tratamiento con estos zumos, en el que se les preguntaba el número de envases consumidos durante la intervención y el número de envases sobrantes al final.

Al inicio del estudio y en las semanas 4, 8, 12 y 16 se realizaron las determinaciones descritas en los puntos 2.2, 2.5, 2.6 y 2.7 de la presente sección.

PUBLICACIONES

1. CUATRO VARIANTES EN LOS GENES DE LA TRANSFERRINA Y DEL HFE COMO MARCADORES POTENCIALES DEL RIESGO DE ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO: ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN MUJERES MENSTRUANTES.

Nutrition & Metabolism (2011). 8: 69-76

Antecedentes: La anemia por deficiencia de hierro es un problema de salud a nivel mundial en el que los factores medioambientales, fisiológicos y genéticos juegan un papel importante. Se han estudiado las asociaciones entre los marcadores del estado de hierro y determinados polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphisms, SNPs), ya conocidos por estar relacionados con el metabolismo del hierro, en mujeres en edad fértil.

Métodos: Un grupo de 270 mujeres menstruantes Caucásicas, población de riesgo de anemia por deficiencia de hierro, participaron en el estudio. Se analizaron parámetros hematológicos y bioquímicos y se seleccionaron 10 SNPs, los cuales fueron genotipados mediante un ensayo de minisequenciación. Las asociaciones entre los datos genéticos y bioquímicos fueron analizadas estadísticamente mediante el test de modelo Bayesiano (BMA) y árboles de decisión. Se evaluó la ingesta dietética de un subgrupo representativo de estas voluntarias (n=141), y se determinó la relación entre nutrientes y biomarcadores de hierro mediante regresión lineal.

Resultados: Cuatro variantes, dos en el gen de la transferrina (rs3811647, rs1799852) y dos en el gen *HFE* (C282Y, H63D), explican el 35% de la variación genética o heredabilidad de la transferrina sérica en mujeres menstruantes. El alelo menor del rs3811647 se asoció con niveles más altos de transferrina sérica y más bajos de saturación de la transferrina, mientras que los alelos menores del rs1799852 y de las mutaciones C282Y y H63D del *HFE* se asociaron con niveles más bajos de transferrina sérica. No se encontraron asociaciones entre la ingesta de nutrientes y los biomarcadores de hierro.

Conclusiones: Al contrario que la ingesta dietética, estos cuatro SNPs están fuertemente asociados con la transferrina sérica. Los portadores del alelo menor del rs3811647 presentan una disminución del transporte de hierro a los tejidos, lo que podría indicar un mayor riesgo de anemia por deficiencia de hierro, aunque la presencia simultánea del alelo menor del rs1799852 y las mutaciones del *HFE* parecen tener un efecto compensatorio. Por tanto, se sugiere que estas variantes genéticas podrían ser utilizadas potencialmente como marcadores del riesgo de anemia por deficiencia de hierro.

Palabras clave: gen de la transferrina, gen *HFE*, transferrina sérica, saturación de la transferrina, anemia por deficiencia de hierro, SNP, mujeres menstruantes, estudio de asociación, marcadores genéticos.

RESEARCH

Open Access

Four variants in transferrin and *HFE* genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women

Ruth Blanco-Rojo¹, Carlos Baeza-Richer², Ana M López-Parra², Ana M Pérez-Granados¹, Anna Brichs³, Stefania Bertonicini^{2,4}, Alfonso Buil³, Eduardo Arroyo-Pardo², Jose M Soria³ and M Pilar Vaquero^{1*}

Abstract

Background: Iron deficiency anaemia is a worldwide health problem in which environmental, physiologic and genetic factors play important roles. The associations between iron status biomarkers and single nucleotide polymorphisms (SNPs) known to be related to iron metabolism were studied in menstruating women.

Methods: A group of 270 Caucasian menstruating women, a population group at risk of iron deficiency anaemia, participated in the study. Haematological and biochemical parameters were analysed and 10 selected SNPs were genotyped by minisequencing assay. The associations between genetic and biochemical data were analysed by Bayesian Model Averaging (BMA) test and decision trees. Dietary intake of a representative subgroup of these volunteers (n = 141) was assessed, and the relationship between nutrients and iron biomarkers was also determined by linear regression.

Results: Four variants, two in the transferrin gene (rs3811647, rs1799852) and two in the *HFE* gene (C282Y, H63D), explain 35% of the genetic variation or heritability of serum transferrin in menstruating women. The minor allele of rs3811647 was associated with higher serum transferrin levels and lower transferrin saturation, while the minor alleles of rs1799852 and the C282Y and H63D mutations of *HFE* were associated with lower serum transferrin levels. No association between nutrient intake and iron biomarkers was found.

Conclusions: In contrast to dietary intake, these four SNPs are strongly associated with serum transferrin. Carriers of the minor allele of rs3811647 present a reduction in iron transport to tissues, which might indicate higher iron deficiency anaemia risk, although the simultaneous presence of the minor allele of rs1799852 and *HFE* mutations appear to have compensatory effects. Therefore, it is suggested that these genetic variants might potentially be used as markers of iron deficiency anaemia risk.

Keywords: Transferrin gene, *HFE* gene, serum transferrin, transferrin saturation, iron deficiency anaemia, SNP, menstruating women, iron intake, association study, genetic markers

Introduction

Iron deficiency is one of the leading risk factors for disability and mortality worldwide, affecting both developing and developed countries with major consequences for human health as well as social and economic improvement. An estimated two billion people are

affected, and menstruating women and children are populations at risk [1].

Iron deficiency anaemia is caused by a wide variety of factors that can be isolated, but more often coexist [2]. It results from any situation in which dietary iron intake does not meet the body's demands. Physiological blood loss frequently contributes to the negative iron balance, but genetic factors also play a role [3].

It is well established that in a situation of iron-deficiency the supply of iron to transferrin is compromised, increasing the serum levels of the protein while

* Correspondence: mpvaquero@ictan.csic.es

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

transferrin saturation and total iron binding capacity are decreased; this leads to ferritin stores being progressively diminished [2]. More recently, hepcidin has emerged as the central regulatory molecule of systemic iron homeostasis, inhibiting ferroportin which mediates iron export from hepatocytes, duodenal enterocytes and macrophages. Hepcidin mRNA is transcriptionally regulated through at least three pathways: interleukin 6 stimulates hepcidin expression through the STAT3 signaling pathway; bone morphogenetic proteins (BMP) increase hepcidin expression through the haemojuvelin/BMP receptor/Smad 4 pathway; and transferrin stimulates hepcidin expression through a transferrin receptor 2 (TfR2)/HFE mediated pathway [4].

Mutations of several genes implicated in iron-overload have been widely studied. Haemochromatosis can be caused by mutations affecting any of the proteins that limit the entry of iron into the blood. In humans, mutations in *HFE*, *TfR2*, haemojuvelin and ferroportin genes can result in haemochromatosis [5].

However, limited information is available about gene variants associated with iron deficiency anaemia [6]. Atransferrinemia, due to rare mutations in the transferrin gene (*TF*), leads to low or undetectable levels of the carrier protein [7]. Mutations in the divalent metal transporter 1 gene have been found in patients with microcytic anaemia, low serum ferritin, and liver iron overload [8]. Recent studies revealed that mutations in the matriptase gene (*TMPRSS6*) cause iron-refractory iron deficiency anaemia [9]. Presence of the mutation G277S of the *TF* gene alone does not affect iron absorption in iron deficient women [10-12] and it has been suggested that a combination of polymorphisms is involved in iron metabolism [13].

The development of genome-wide association studies (GWAS) make it possible to associate genetic variations, such as single nucleotides polymorphisms (SNPs), with traits that could be related to a disease. Recent GWAS studies are available on clinically relevant haematological traits that determine iron status, such as haemoglobin levels, mean corpuscular volume, serum ferritin, serum transferrin and transferrin saturation [14-17]. Benyamin et al. (2009) demonstrated that three variants in *TF* plus the *HFE* C282Y mutation explain approximately 40% of genetic variation in serum transferrin [18]. Remacha et al. (2006) detected two quantitative trait loci that suggest linkage to soluble transferrin receptor [19].

All of these studies provide insight into haematopoietic pathways and reveal genetic variants that may predispose some individuals to iron deficiency and related disorders. The present study is part of a wider project aimed at investigating the influence of dietary, physiological, and genetic risk factors on iron deficiency anaemia. In this work, the associations between iron status biomarkers and 10 SNPs known to be related with iron

metabolism were studied in menstruating women, a population group at risk of iron deficiency anaemia.

Design and methods

Subjects

A group of 270 menstruating women participated in the study. The inclusion criteria were: Caucasian, aged 18-45 years, non-smoker, non-pregnant, non-breastfeeding. Subjects were excluded from the study if they had amenorrhea, menopause, thalassaemia, haemochromatosis, chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn disease, gastric ulcers, celiac disease, haemorrhagic diseases) or renal disease.

The study protocols were approved by the Clinical Research Ethics Committee of *Hospital Puerta de Hierro*, Madrid and the Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain.

Dietary control and anthropometric measures

The dietary intake and anthropometric measures of a randomly selected subgroup of these volunteers were assessed ($n = 141$). They completed a 72-h detailed dietary intake report, previously validated and proved valuable to assess nutrient intake [20,21], specifying the types of food consumed and serving weights. Daily food, energy intake, nutrient intake and energy provided by macronutrients were calculated by a computer application using the Spanish Food Composition Database [22].

Anthropometric measures were taken using standardised procedures. Body weight was measured with a calibrated Seca scale (to a precision of 100 g) and height was measured at baseline with a stadiometer incorporated into the scale. Body mass index (BMI) was calculated as weight/height squared (kg/m^2).

Blood sampling and biochemical assays

Blood samples were collected by venipuncture after a 12-h fasting period, between 08:00 h and 09:00 h. Serum and plasma were obtained after centrifugation at 1000 g for 15 minutes and stored at -80°C .

Total red blood cells, haematocrit, mean corpuscular volume (MCV) and haemoglobin were determined following standard laboratory techniques using the Symex NE 9100 automated haematology analyser (Symex, Kobe, Japan). Serum iron, serum ferritin and serum transferrin were determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyser (Roche, Basel, Switzerland). Transferrin saturation (%) was calculated as follows: serum iron ($\mu\text{mol/L}$)/TIBC ($\mu\text{mol/L}$) $\times 100$, where TIBC is total iron binding capacity, calculated as $25.1 \times \text{transferrin (g/L)}$.

SNP's selection and genetic analysis

A total of 10 SNPs, known to be related to iron metabolism, were selected from the bibliography. Six of them

(rs3811647, rs1799852, rs2280673, rs1800562, rs4820268 and rs855791) were described in independent GWAS to be related to iron biomarkers [14-18] and three more (rs16826756, rs2673289 and rs1375515) were selected by The HapMap Project (<http://www.hapmap.org/>) from two linkage signals described by Remacha et al [19]. The last one (rs1799945) was chosen for its importance in iron-related diseases [23].

A 10-multiplex minisequencing assay (SNaPshot) was developed to genotype the 10 SNPs. Conditions of this multiplex method were reported previously [24].

Statistics analysis

A normal distribution of the parameters was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. Serum ferritin values were log transformed for statistical testing. Genotype data quality was verified for each SNP by testing for Hardy-Weinberg equilibrium using Chi-squared test. Pearson's correlation was used to study the associations between quantitative variables.

Bayesian Model Averaging (BMA) was used to analyse the associations between SNPs and variables (iron status parameters), assuming a co-dominance model. BMA accounts for the model uncertainty inherent in the variable selection process by averaging over the best models according to approximate posterior model probability. BMA estimates all of the possible models and calculates a probabilistic average of the effect of each SNP. The significance threshold was a posterior effect probability ($P(\beta \neq 0|D) \geq 75\%$).

The proportion of the variance of one parameter explained by one SNP is calculated as follows: $[\text{Var}(\text{phenotype}) - \text{Var}(e)] / \text{Var}(\text{phenotype})$, where $\text{Var}(\text{phenotype})$ is the variance of the parameter and $\text{Var}(e)$ is the variance of the residuals of the best model.

The relations between SNPs and variables were also tested by a Chi-square automatic interaction detection decision tree. Data are presented in a hierarchical way according to the SNP that better explains the differences in the studied variable. Each generated subdivision is again divided according to the existence of new predictors with a significant effect. The minimum size a node could present to be divided to was 20 individuals and the minimum size in a child node was 5 individuals, and the significance threshold was $p \leq 0.01$.

Chi-squared test was performed by GenePop software (version 4.0). The Kolmogorov-Smirnov test, Pearson's correlation and decision tree were carried out by SPSS statistical package for Windows (version 17.0) and the BMA analysis was carried out using R statistic package.

Results

Age of the participating women was 24.3 ± 4.8 years (mean \pm SD) and body mass index (kg/m^2) 21.7 ± 2.2 .

Table 1 Iron biomarkers of the total group and the subgroup of volunteers

	Total group (n = 270)	Subgroup (n = 141)
Haemoglobin (g/dl)	13.1 \pm 0.9	13.2 \pm 0.9
Haematocrit (%)	39.2 \pm 2.7	39.2 \pm 2.8
Mean Corpuscular Volume (fl.)	87.2 \pm 5.0	86.9 \pm 5.0
Serum Ferritin (ng/ml)	25.1 \pm 21.3	25.5 \pm 16.9
Serum Transferrin (mg/dl)	307.5 \pm 54.1	311.5 \pm 56.7
Serum iron ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	81.7 \pm 37.5	80.0 \pm 36.
Transferrin saturation (%)	19.4 \pm 10.2	18.8 \pm 8.7

Differences between groups were not significant. Data are mean \pm SD

There were no significant differences between iron status biomarkers of the total group and the subgroup of volunteers whose dietary intake was assessed (Table 1). Dietary characteristics of the subgroup are presented on Table 2. No significant associations between nutrient intake and iron status parameters were found.

There were significant negative correlations between serum transferrin and haemoglobin, haematocrit, MCV, serum ferritin, and transferrin saturation ($p < 0.001$), but the correlation between serum transferrin and serum iron was not significant. All of the studied SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium and presented a minor allele frequency (MAF) higher than 0.01, therefore none of them were removed from the study.

Table 3 presents the results of the association analysis between the 10 SNPs and serum transferrin, obtained by BMA. It contains the posterior means (the mean effect of the SNP across all the calculated models), standard deviations and posterior effect probabilities ($P(\beta \neq 0|D)$) of the SNPs to be associated with serum transferrin, and shows the models with the highest posterior probabilities, from a total of 2^{10} possible models. Four SNPs, (rs3811647, rs1800562, rs1799945, rs1799852) were included in the best model according to its posterior model probability, 43.8%, which is much higher than that of the second model (18.3%).

Table 2 Energy and nutrient intake

Energy (kcal)	2125 \pm 578
Protein (g)	83.3 \pm 22.4
Carbohydrate (g)	215.7 \pm 63.7
Lipid (g)	97.4 \pm 30.4
Protein (% energy)	15.8 \pm 6.6
Carbohydrate (%energy)	44.1 \pm 7.2
Lipid (%energy)	40.3 \pm 8.0
Dietary fiber (g)	19.2 \pm 7.0
Calcium (mg)	937 \pm 306
Iron (mg)	14.1 \pm 4.2
Vitamin C (mg)	124.0 \pm 58.5

Data are mean \pm SD. n = 141 volunteers

Table 3 BMA association analysis between the 10 SNPs and serum transferrin

SNP	$P(\beta \neq 0 D)$	Mean βD	SD βD	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5
Intercept	100	304.746	6.724	307.878	300.740	301.542	305.256	303.681
rs4820268	4.6	0.205	1.318					4.475
rs855791	3.5	0.109	0.987					
rs1799852	78	-15.896	10.747	-20.255		-21.078	-20.386	-20.314
rs2280673	2.8	0.039	0.812					
rs1800562	100	-44.213	12.089	-44.875	-45.083	-40.336	-44.997	-44.276
rs3811647	100	21.223	5.224	20.322	24.300	20.720	20.267	20.042
rs2673289	4.4	0.190	1.278					
rs1375515	2.8	0.037	0.810					
rs1799945	85.6	-13.482	7.486	-15.737	-16.293		-15.044	-15.134
rs16826756	5.5	0.357	1.961				6.514	
nVar				4	3	3	5	5
r ²				0.169	0.146	0.142	0.173	0.172
BIC				-27.431	-25.688	-24.606	-23.278	-22.919
Posterior model probability				0.438	0.183	0.107	0.055	0.046

$P(\beta \neq 0|D)$: Probability of the SNP to be associated to the variable. Mean $\beta|D$: Posterior mean of the beta parameter (weighted average of the posterior means of beta under each of the models). SD $\beta|D$: Standard deviation of each beta. Model1...5: Most probable multiple-SNP models. nVar: Number of SNPs included in the model. BIC: Bayesian Information Criterion. r²: Coefficient of determination

The SNPs rs3811647 and rs1799852, located in the transferrin gene, yielded probabilities of 100% and 78% respectively of being associated with serum transferrin. Each A allele of the rs3811647 has an additive effect of 20.32 in the levels of serum transferrin while the T allele of rs1799852 presents an reducing effect of 20.25. These two SNPs explained 8.08% (rs3811647) and 5.55% (rs1799852) of the total variation of serum transferrin.

The SNPs rs1800562 (C282Y) and rs1799945 (H63D), located in the *HFE* gene, yielded probabilities of 100% and 85.6% respectively of being associated with transferrin levels. The A allele of rs1800562 accounts for a mean reduction of 44.87 in the levels of transferrin, which is the largest effect out of the four SNPs included in the best model, whereas SNP rs1799945 presents a negative mean effect of each G allele of 15.73. These two SNPs explain 3.07% and 2.40% of the total variation in transferrin respectively.

In the best model, the total phenotypic variation of serum transferrin explained by these SNPs (rs3811647, rs1799852, rs1800562 and rs1799945) is 16.9%.

There were no associations between SNPs rs4820268, rs855791, rs2280673, rs2673289, rs1375515, rs16826756 and levels of serum transferrin (Table 3). The associations between any of the SNPs and the other studied iron biomarkers were not significant by BMA (models not presented).

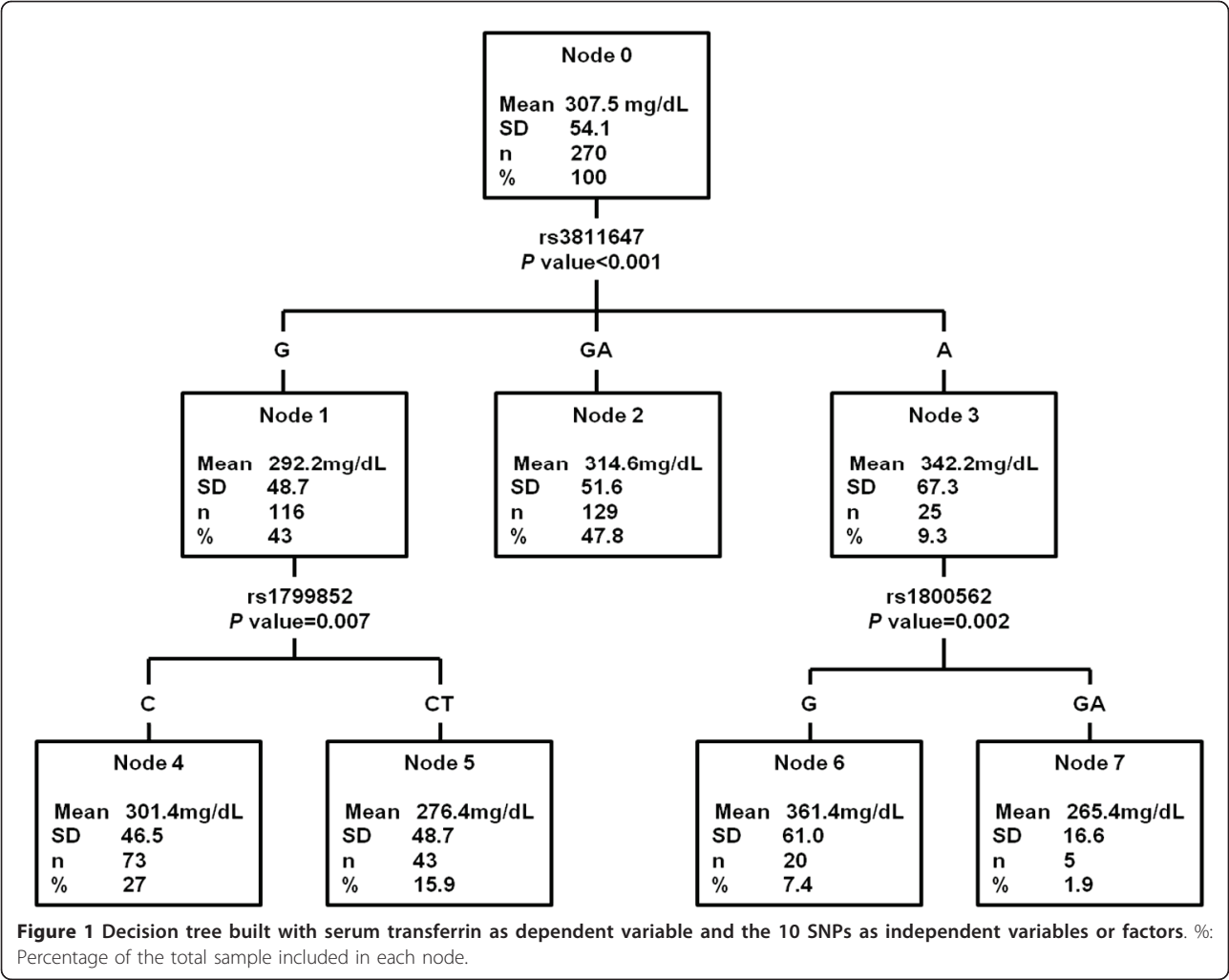
Figures 1 and 2 show the decision trees for serum transferrin and transferrin saturation. With regard to serum transferrin, rs3811647 is the SNP that better explains this variable. Serum transferrin was significantly higher in AA women (342.2 ± 67.3 mg/dL) than AG heterozygous (314.6 ± 51.6 mg/dL) and GG homozygous

(292.2 ± 48.7 mg/dL) ($p < 0.001$). The GG node for SNP rs3811647 is subdivided into two subgroups for the presence of rs1799852 (nodes 4 and 5). The CC genotype for this SNP presented significantly higher values of serum transferrin levels (301.4 ± 46.5 mg/dL) than the CT genotype (276.4 ± 48.7 mg/dL). The homozygous AA node for rs3811647 is subdivided into two other subgroups for the presence of SNP rs1800562 (C282Y) (nodes 6 and 7). The GG genotype for this SNP presented significantly higher values of serum transferrin levels (361.4 ± 61.0 mg/dL) than the GA genotype (265.4 ± 16.6 mg/dL). No subjects homozygous for T in rs1799852 or for A in C282Y mutation were found.

Accordingly, rs3811647 was also found to be the SNP that better explained transferrin saturation (Figure 2), with significantly lower values in AA and AG women ($18.2 \pm 8.7\%$) compared to GG homozygous women ($21.8 \pm 10.9\%$) ($p = 0.007$).

Discussion

The present study shows that four SNPs, two in the *TF* gene and two others in the *HFE* gene, explain a large proportion of the genetic variation of serum transferrin in a group of menstruating women. In the best model calculated by BMA, the total phenotypic variation of serum transferrin explained by these SNPs is 16.9%. The estimated heritability of serum transferrin for Caucasian woman, which is the proportion of phenotypic variation in a population due to genetic variation, is 0.49 [25]. Therefore, these four SNPs can explain approximately 35% of the total genetic variation or heritability for serum transferrin in this population group (calculated as $16.9/0.49$).



The dietary study showed that mean dietary iron intake was below the Recommended Dietary Allowance for this population group (18 mg/day) [26], which, as previously reported by our research group [27,28], is not easily reached in menstruating women. Although the influence of dietary components on iron absorption is well known [29], in the present study no association between nutrient intake and iron biomarkers was found. This is outstanding taking into account the wide range in iron biomarker levels that these volunteers presented. Moreover, these results are in agreement with other findings of our research group obtained in a study that compared iron status after consuming red meat or fish-based diets [27].

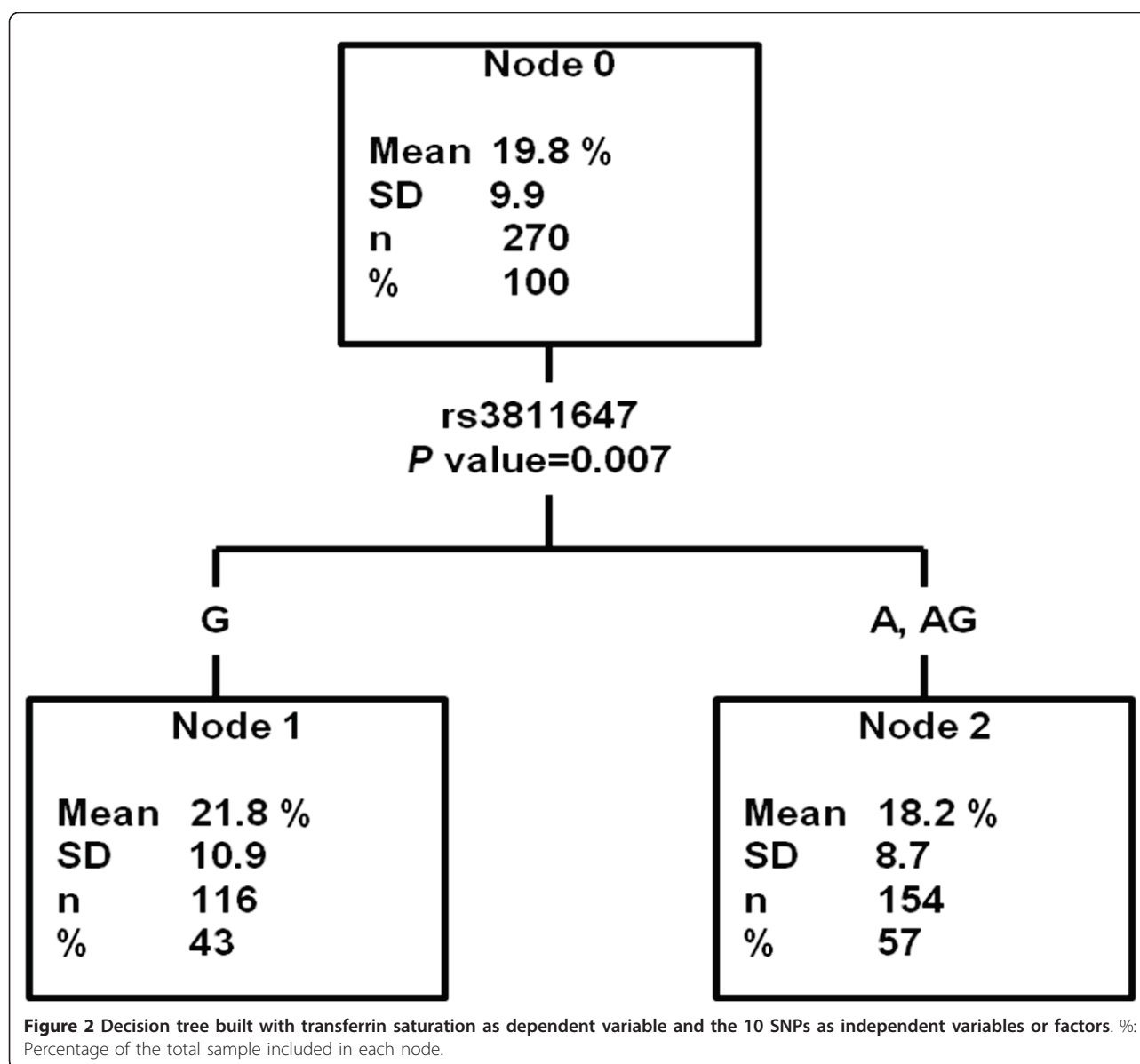
Serum transferrin and transferrin saturation are valid parameters that reflect iron status in this group of menstruating women as serum transferrin was inversely correlated with serum ferritin, haemoglobin, MCV, haematocrit and transferrin saturation [2].

Regarding the SNPs in *TF*, the two statistical analyses used led to coincident results, indicating that the

presence of the minor allele A in rs3811647 is related to higher circulating transferrin levels whereas the minor allele T in rs1799852 relates to lower levels. These results from a sample of menstruating Caucasian women are consistent with and replicate data obtained by GWAS in other population groups [17,18,30].

SNP rs3811647 is situated in intron 11 and rs1799852 is a non-synonymous coding SNP in exon 17 of *TF*. As these *TF* variants are associated with serum transferrin concentration, they would appear to be involved at a transcriptional or posttranscriptional level [31]. In this sense, further studies should be done in order to study the influence that these two SNPs could have on the action of these transcription factors and on transferrin expression.

Present results also show that rs3811647 is associated with transferrin saturation, in agreement with the association observed with serum transferrin and with findings obtained in other populations [18]. Considering that transferrin saturation is a marker of the iron supply



to tissues, A carriers present a reduction in iron transport to tissues, as occurs in iron deficiency anaemia. Another study found that SNP rs3811647 was also associated with ferritin, although to a lesser degree than with transferrin and transferrin saturation [18]. In the present study, however, an association between this SNP and serum ferritin was not observed, which can be explained as ferritin is the final marker of iron stores, indirectly related to iron transport, and also due to the sample size.

The other two SNPs included in the best model for the BMA test, rs1800562 and rs1799945 (C282Y and H63D mutation respectively), are in *HFE*. The minor allele of C282Y was associated with lower levels of serum transferrin, which is consistent with other studies

[17,18,30]. Moreover, the present study shows that H63D was also associated with serum transferrin. Both SNPs are well known to be related to type I haemochromatosis [5], however the information concerning their roles in iron deficiency is very scarce. High iron status was observed in heterozygotes women, for either C282Y or H63D, compared with women lacking these mutations [32-34]. The present results confirm previous observations of our group [13] and support the hypothesis that C282Y and H63D mutations could have a protective effect against the development of anaemia in menstruating women. In this line, studies suggest that the haemochromatosis gene may have spread because of a selective advantage through protection of heterozygotes against iron deficiency [33,35].

The study of interactions of these variants shows that the presence of G in rs3811647 and T in rs1799852 has a cumulative effect, with carriers of these variants presenting lower serum transferrin levels (Figure 1). In the presence of the minor allele A in rs3811647, that has been clearly associated with higher transferrin levels, the simultaneous presence of A in C282Y has a compensating favourable effect.

These four SNPs in *TF* and *HFE* may play a role in iron regulation because, as suggested in a recent study, the Tf/TfR2/HFE complex is critical for hepcidin regulation, and the concentration of diferric serum transferrin may act as a positive regulator, increasing hepcidin expression [36]. Mutations in either *TfR2* or *HFE* can result in iron overload, which is characterised by low hepcidin expression [37]. However, there is no information concerning the possible compensatory effect on iron overload of the minor allele A of rs3811647. As these SNPs are found in genes for interrelated proteins that participate in one of the iron-metabolism pathways, it is suggested that the determination of these SNPs may be useful and may have clinical repercussions either in cases of iron deficiency or iron overload.

This work was focused on menstruating women because they present a high iron deficiency anaemia risk. According to WHO criteria [2], in this group of menstruating women, 10.6% were anaemic, 45.8% iron deficient and 43.7% iron sufficient women. This study replicates the associations between SNPs and serum transferrin and transferrin saturation observed previously in general population [17,18,30] and in *HFE* mutation carriers [38], which is remarkable, considering the size of this selected sample of menstruating women. In addition, a new finding concerning the association between H63D and serum transferrin, and the effects of the interactions between SNPs are presented.

It is well known that environmental factors, such as menstrual losses and nutrition, play an important role in the development of iron deficiency anaemia. Regarding menstruation, McLaren et al recently published a genetic association study excluding menstruating women in order to eliminate this possible confounding factor [30]. However, our results are in agreement with the association between rs3811647 and TIBC found by those authors, and in addition, an association between this SNP and transferrin saturation was found.

These data suggest that, even though there are environmental and physiological factors involved in the development of iron deficiency anaemia, there are other factors, such as genetics, that could predispose to the disease. This may influence the choice of strategies for the prevention of iron deficiency anaemia in the population. In this regard, our group carried out a placebo-controlled nutritional intervention with an iron fortified

food in iron deficient women. The iron-fortified food markedly increased iron status, except in women that presented the minor allele of SNP rs3811647 [39]. These results may add new information to the area of nutrigenetics and nutrigenomics, since research on iron metabolism and gene-diet interaction is scarce.

To sum up, a large percentage of genetic variation of serum transferrin was explained by two SNPs located in the *TF* gene (rs3811647, rs1799852) and two in the *HFE* gene (C282Y, H63D) in menstruating women. In contrast to dietary intake, these SNPs are strongly associated with serum transferrin, and A carriers of rs3811647 present a reduction in iron transport to tissues, which might indicate higher iron deficiency anaemia risk. Moreover, the study of interactions of these variants shows that presence of the different alleles could have a cumulative or compensable effect in serum transferrin levels. Therefore, it is suggested that these genetic variants might potentially be used as markers of iron deficiency anaemia risk.

Further investigations in anaemic and non-anaemic subjects should be designed to increase the existing knowledge of the relationship between genetic variants and iron deficiency anaemia, and the possible modulating effect of diet and menstruation. Present results may be also useful to increase knowledge on iron overload disorders. It is also important to study the possible gene-diet interaction effects on the recovery of iron status. Finally, other studies should be carried out to explore the mechanisms by which these variants, or combination of variants as in haplotypes, affect iron metabolism at the transcriptional and postranscriptional levels and also at the functional level.

List of abbreviations

SNP: single nucleotide polymorphism; TfR2: transferrin receptor 2; GWAS: genome-wide association study; MCV: mean corpuscular volume; BMA: bayesian model averaging; TIBC: total iron binding capacity.

Acknowledgements

The authors are grateful to I. Wright for technical support. This study was supported by Project AGL2009-11437. R.Blanco-Rojo was supported by a JAE-predoc grant from CSIC and European Social Found, S.Bertoncini by Grupo Santander 2009 (*Estancia doctores y tecnólogos UCM*), and J.M.Soria by "Programa d'Estabilització d'Investigadors de la Direcció d'Estratègia i Coordinació del Departament de Salut".

Author details

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain. ²Department of Toxicology and Health Legislation, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Spain. ³Unit of Genomic of Complex Diseases, Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain. ⁴Department of Biology, University of Pisa, Pisa, Italy.

Authors' contributions

The authors' contributions were as follows- RBR: drafted the manuscript; RBR and AMPG: recruited the participants, collected data, performed biochemical analysis and nutrient determination; CB, AMLP and EAP participated in the genetic study design; RBR, CB, AMLP and SB performed the genotyping; ABu, ABu and JMS participated in the statistical analysis; MPV participated in the

study design, contributed to the drafting, and obtained funding. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 June 2011 Accepted: 6 October 2011

Published: 6 October 2011

References

- World Health Organization: *Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005*. WHO Global Database on Anaemia Geneva; 2008.
- World Health Organization: *Assessing the iron status of populations* Geneva; 2007.
- Whitfield JB, Treloar S, Zhu G, Powell LW, Martin NG: **Relative importance of female-specific and non-female-specific effects on variation in iron stores between women**. *Br J Haematol* 2003, **120**:860-866.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C: **Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism**. *Cell* 2010, **142**:24-38.
- Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ: **Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches**. *Clin Chem* 2006, **52**:950-968.
- Andrews NC: **Forging a field: the golden age of iron biology**. *Blood* 2008, **112**:219-230.
- Beutler E, Gelbart T, Lee P, Trevino R, Fernandez MA, Fairbanks VF: **Molecular characterization of a case of atransferrinemia**. *Blood* 2000, **96**:4071-4074.
- Iolascon A, De Falco L, Beaumont C: **Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis**. *Haematologica* 2009, **94**:395-408.
- Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, Mayo MM, Samuel SM, Strouse JJ, Markianos K, *et al*: **Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA)**. *Nat Genet* 2008, **40**:569-571.
- Sanria B, Navas-Carretero S, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Arroyo-Pardo E, Roe MA, Teucher B, Vaquero MP, Fairweather-Tait SJ: **The G277S transferrin mutation does not affect iron absorption in iron deficient women**. *Eur J Nutr* 2007, **46**:57-60.
- Aisen P: **The G277S mutation in transferrin does not disturb function**. *Br J Haematol* 2003, **121**:674-675.
- Delanghe J, Verstraeten H, Pynaert I, Debels L, Taes Y, Verhasselt B, De Henauw S, Temmerman M: **Human transferrin G277S mutation and iron deficiency in pregnancy**. *Br J Haematol* 2006, **132**:249-250.
- Sanria B, López-Parra AM, Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP: **Hepcidin, transferrin (exon 7), and hemochromatosis genotyping suggests that haplotype block analysis is the best strategy for predicting iron deficiency phenotype in women**. *Nutrition Research* 2007, **27**:672-678.
- Soranzo N, Spector TD, Mangino M, Kuhnel B, Rendon A, Teumer A, Willenborg C, Wright B, Chen L, Li M, *et al*: **A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium**. *Nat Genet* 2009, **41**:1182-1190.
- Ganesh SK, Zakai NA, van Rooij FJ, Soranzo N, Smith AV, Nalls MA, Chen MH, Kottgen A, Glazer NL, Dehghan A, *et al*: **Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium**. *Nat Genet* 2009, **41**:1191-1198.
- Chambers JC, Zhang W, Li Y, Sehmi J, Wass MN, Zabaneh D, Hoggart C, Bayele H, McCarthy MI, Peltonen L, *et al*: **Genome-wide association study identifies variants in TMPRSS6 associated with hemoglobin levels**. *Nat Genet* 2009, **41**:1170-1172.
- Benyamin B, Ferreira MA, Willemsen G, Gordon S, Middelberg RP, McEvoy BP, Hottenga JJ, Henders AK, Campbell MJ, Wallace L, *et al*: **Common variants in TMPRSS6 are associated with iron status and erythrocyte volume**. *Nat Genet* 2009, **41**:1173-1175.
- Benyamin B, McRae AF, Zhu G, Gordon S, Henders AK, Palotie A, Peltonen L, Martin NG, Montgomery GW, Whitfield JB, Visscher PM: **Variants in TF and HFE explain approximately 40% of genetic variation in serum-transferrin levels**. *Am J Hum Genet* 2009, **84**:60-65.
- Remacha AF, Souto JC, Soria JM, Buil A, Sarda MP, Lathrop M, Blangero J, Almasly L, Fontcuberta J: **Genomewide linkage analysis of soluble transferrin receptor plasma levels**. *Ann Hematol* 2006, **85**:25-28.
- de Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, Hautvast JG: **Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA Study**. *Eur J Clin Nutr* 1996, **50**(Suppl 2):S123-124.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Vaquero MP: **An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young iron-deficient women**. *Br J Nutr* 2009, **102**:546-553.
- DIAL Alce ingenieria. [http://www.alceingenieria.net/nutricion.htm].
- Worwood M: **HFE Mutations as risk factors in disease**. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002, **15**:295-314.
- Bertoncini S, Blanco-Rojo R, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP, Lopez-Parra AM: **A novel SNaPshot assay to detect genetic mutations related to iron metabolism**. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011, **15**:173-179.
- Whitfield JB, Cullen LM, Jazwinska EC, Powell LW, Heath AC, Zhu G, Duffy DL, Martin NG: **Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins**. *Am J Hum Genet* 2000, **66**:1246-1258.
- Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc* Washington DC; 2001.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Sanria B, Carbajal A, Vaquero MP: **Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet**. *J Physiol Biochem* 2009, **65**:165-174.
- Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP: **Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women**. *Br J Nutr* 2011, **105**:1652-1659.
- Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP: **Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health**. *Nutr Hosp* 2010, **25**:350-365.
- McLaren CE, Garner CP, Constantine CC, McLachlan S, Vulpe CD, Snively BM, Gordeuk VR, Nickerson DA, Cook JD, Leindecker-Foster C, *et al*: **Genome-wide association study identifies genetic Loci associated with iron deficiency**. *PLoS One* 2011, **6**:e17390.
- Zakin MM, Baron B, Guillou F: **Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene**. *Dev Neurosci* 2002, **24**:222-226.
- Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Waalen J: **Haematological effects of the C282Y HFE mutation in homozygous and heterozygous states among subjects of northern and southern European ancestry**. *Br J Haematol* 2003, **120**:887-893.
- Datz C, Haas T, Rinner H, Sandhofer F, Patsch W, Paulweber B: **Heterozygosity for the C282Y mutation in the hemochromatosis gene is associated with increased serum iron, transferrin saturation, and hemoglobin in young women: a protective role against iron deficiency?** *Clin Chem* 1998, **44**:2429-2432.
- Rossi E, Olynyk JK, Cullen DJ, Papadopoulos G, Bulsara M, Summerville L, Powell LW: **Compound heterozygous hemochromatosis genotype predicts increased iron and erythrocyte indices in women**. *Clin Chem* 2000, **46**:162-166.
- Motulsky AG: **Genetics of hemochromatosis**. *N Engl J Med* 1979, **301**:1291.
- Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA: **Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression**. *Cell Metab* 2009, **9**:217-227.
- Darshan D, Frazer DM, Anderson GJ: **Molecular basis of iron-loading disorders**. *Expert Rev Mol Med* 2010, **12**:e36.
- Constantine CC, Anderson GJ, Vulpe CD, McLaren CE, Bahlo M, Yeap HL, Gertig DM, Osborne NJ, Bertalli NA, Beckman KB, *et al*: **A novel association between a SNP in CYBRD1 and serum ferritin levels in a cohort study of HFE hereditary haemochromatosis**. *Br J Haematol* 2009, **147**:140-149.
- Blanco-Rojo R, Pérez-Granados AM, López-Parra AM, Baeza C, Bertoncini S, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP: **Variants in transferrin gene affect iron metabolism and response to an iron supplemented food in menstruating women**. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 2010, **3**:72.

doi:10.1186/1743-7075-8-69

Cite this article as: Blanco-Rojo *et al*: Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. *Nutrition & Metabolism* 2011 **8**:69.

2. EL SNP INTRÓNICO RS3811647 DEL GEN DE LA TRANSFERRINA HUMANO, MODULA SU EXPRESIÓN EN CÉLULAS HEPÁTICAS

Biochemical and Biophysical Research Communications (2012), enviado.

Antecedentes: La transferrina (Tf) ejerce una función crucial en el mantenimiento de la homeostasis sistémica del hierro. Nuestro objetivo fue estudiar el papel del rs3811647 en la expresión de la transferrina.

Diseño y métodos: Células Hep3B fueron co-transfectadas con vectores que contenían las variantes A (*VarA-TF-luc*) y G (*VarG-Tf-luc*) del rs3811647, utilizándose la luciferasa como marcador de la expresión del gen *Tf*.

Resultados: Los ensayos con la luciferasa mostraron un mayor aumento de la expresión del gen *Tf* en presencia de la variante A comparada con la G ($p < 0.05$).

Conclusión: El alelo A del SNP rs3811647 incrementa la expresión del gen *Tf* de modo que podría modular la variación interindividual en los niveles de transferrina sérica observados en diferentes poblaciones.

Palabras clave: gen de la transferrina, SNP rs3811647, transferrina sérica, metabolismo del hierro, expresión génica.

Intronic SNP rs3811647 of the human transferrin gene modulates its expression in hepatoma cells

Ruth Blanco-Rojo^{1,2}, Henry K. Bayele², Surjit K.S. Srai² and M. Pilar Vaquero¹.

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Madrid, Spain; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London, London, UK.

Correspondence: M. Pilar Vaquero

Grupo de Minerales en Metabolismo y Nutrición Humana

Departamento de Metabolismo y Nutrición

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN)

C/José Antonio Novais, 10

28040 Madrid, Spain

Tel +34 91 5492300; Fax +34 91 5493627

Email: mpvaquero@ictan.csic.es

Funding: This study was supported by Project AGL2009-11437. R. Blanco-Rojo was supported by a JAE-predoc grant from CSIC and European Social Found.

Abstract

Background: Transferrin (Tf) exerts a crucial function in the maintenance of systemic iron homeostasis. Here, our aim was to study the role of rs3811647 in *Tf* expression.

Design and Methods: Hep3B cells were co-transfected with constructs containing A (*VarA-Tf-luc*) and G (*VarG-Tf-luc*) variants of rs3811647, using luciferase as a surrogate reporter of *Tf* expression.

Results: Luciferase assays showed a higher intrinsic enhancer activity ($p < 0.05$) in the A compared with the G variant.

Conclusion: The A allele of SNP rs3811647 increases *Tf* expression in a manner that might underlie inter-individual variation in serum transferrin levels observed in different population groups.

Key words: Transferrin gene, SNP rs3811647, Serum transferrin, Iron metabolism, Gene expression.

Introduction

Transferrin (Tf) is an iron-binding plasma protein that delivers iron to cells via the transferrin receptor pathway (1). A molecule of Tf can bind two atoms of ferric iron with high affinity. Iron chelation by transferrin serves three main purposes: to maintain ferric iron in a soluble form under physiologic conditions; to facilitate regulated iron transport and cellular uptake, and to maintain ferric iron in a redox-inert state, avoiding the generation of free radicals (2). Moreover, diferric Tf stimulates hepcidin expression, the central regulatory molecule of systemic iron homeostasis, through a TfR2/HFE mediated pathway (3).

The expression of the *Tf* gene is controlled by transcriptional mechanisms and is tissue-specific (4). Many environmental factors are known to affect plasma Tf levels: in iron deficiency, the rate of Tf synthesis in the liver increases significantly (5), whereas inflammatory or immunologic stimuli may decrease the levels of circulating Tf (6). Recent studies observed increased Tf levels under hypoxia, a response that may facilitate iron supply for erythropoiesis (7). Nevertheless, little is known about the genetic factors that influence Tf levels in humans, although its expression pattern appears to show sexual dimorphism (8). Our research group recently published that only a few SNPs could explain a large percentage of the heritable variation of serum transferrin levels; one of these loci is SNP rs3811647, located in intron 11 of the human transferrin gene (*Tf*) (9), which as in agreement with other data from the bibliography (10). Based on these studies, we hypothesised that SNP rs3811647 increases transferrin expression. Here we show that this SNP constitutes an intronic enhancer that modulates *Tf* expression in hepatoma cells.

Design and Methods

Plasmid constructs

A fragment of approximately 500 bp of intron 11 of the human transferrin gene (*Tf*), encompassing the SNP rs3811647, was amplified from placental genomic DNA with the following primers: sense, CATGCTAGCGGCTTGACACAGGATTTT; antisense,

CATCTCGAGAATCAGTGGAAGTGGCAAGG; *NheI* and *XhoI* restriction sites are underlined. The cycling parameters were: 95°C for 5 minutes, then 95°C for 5 minutes (denaturation), 62°C for 1 minute (annealing), and 72°C for 1 minute (extension); 35 cycles of PCR were performed with a final extension for 10 minutes at 72°C. The PCR product was subcloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Southampton, United Kingdom) and sequenced for verification of the nucleotide sequence (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) and to confirm the presence of the A allele. The construct was digested with *NheI* and *XhoI* (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom), and the insert was purified with GeneClean (BIO101; Anachem, Luton, United Kingdom) and ligated into the *NheI* and *XhoI* sites of pGL3Promoter (Promega) to generate *VarA-Tf-luc*.

Site-directed mutagenesis

VarA-Tf-luc was subjected to site-directed mutagenesis using the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis system (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) as instructed by the manufacturer. To change the A to G alleles we synthesized a mutagenic primer (mutations in lowercase) as follows: GGGAGTTTACAGACAGATCgTCTAGGATTATACATCTAGGAAGGG. After initial denaturation for 5 minutes at 95°C, PCR cycling parameters were 95°C (5 minutes), 55°C (1 minute), and 65°C (11 minutes and 12 seconds), for a total of 30 cycles. Plasmids were sequenced to verify that the intended mutation had occurred. The resulting construct was designated *VarG-Tf-luc*.

Cell culture, transfection and luciferase assay

The human hepatoma cell line Hep3B was obtained from Antonello Pietrangelo and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and antibiotics/antimycotics (Invitrogen). Cells were grown under standard cell culture conditions of 37°C and 5% CO₂; for transfection, cells were seeded in 24-well plates at densities of approximately 10⁴ cells/well. Cells were transfected with 100 ng/well of *VarA-Tf-luc* or *VarG-Tf-luc* with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), as instructed by the manufacturer. As internal control, 50 ng of pSVβgal vector (Promega) was included in all transfections to normalize transfection efficiencies. Cells were

harvested after 48 hours for reporter assays; luciferase activities were determined with the luciferase assay reagent and β -galactosidase (β gal) activity was measured using the Beta-Glo reagent (both from Promega). Luminescence was measured in a Tropix TR717 microplate luminometer (Applied Biosystems); luciferase levels were normalized with respect to β gal activity in the samples.

Statistical analysis

Pairwise comparisons of control and SNP constructs were made using ANOVA test. A *P* value of 0.05 was considered significant. Graphs were plotted with the GraphPad Prism software and data were analysed using the SPSS statistical package for Windows (version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results and discussion

Using reporter assays in which fragments of the intron encompassing this SNP were ligated to firefly luciferase as *Tf* surrogate, we found that the A allele enhanced gene expression compared with the G allele. The fold activation of the *VarA-Tf-luc* construct was significantly higher ($p < 0.05$) than that of the *VarG-Tf-luc* construct (Fig 1). In other words, the A allele of the SNP rs3811647 supports higher *Tf* expression than the G allele in hepatocytes. These results can be validated by the findings that our research group obtained in a group of menstruating women. We found that serum transferrin was significantly higher in AA homozygous women than in AG heterozygous and GG homozygous ($p < 0.01$), and serum transferrin saturation was significantly higher in GG than in AG and AA women ($p = 0.01$) (9). Also, the in-vitro results confirm previous observations in different population groups (10-13) and add new information concerning the functionality of rs3811647. We therefore suggest that basal differences in circulating Tf levels between individuals may be ascribed to SNP rs3811647, which is located in intron 11 of *Tf* gene (Chr3q22.1).

The tissue-specificity of *Tf* expression is accomplished by the recruitment of different combinations of transcription factors. In hepatocytes, binding sites of

transcription factors that are well-known to regulate *Tf* expression have been described. Proximal region I (PRI) and proximal region II (PRII) within the *Tf* promoter positively regulate its expression in the liver whereas distal regions repress *Tf* expression (14). However, our study shows that in addition to the positive regulation of *Tf* by proximal promoter elements, there are intronic elements such as rs3811647 that could act as enhancers of *Tf* transcription. This is intriguing because no known function especially in relation to relative risk would have been predicted for intronic sequences (15), considering that disease associations have hitherto been limited to coding-region mutations only. *In silico* analysis (<http://www.gene-regulation.com>) of this SNP showed that the A allele in rs3811647 might constitute a binding site for the transcription factor Nuclear Factor-1 (Fig 2). This transcription factor is involved in the transcription of the human *Tf* in the liver (4, 14) but its contribution within the context of rs3811647 remains to be determined. Although it is more frequent to find regulatory regions upstream of the start site of transcription, in some cases transcription factors are able to drive gene expression from within coding regions (16). It is therefore not entirely surprising that we found regulatory regions within the *Tf* intron.

In our previous study, the women that presented the A allele also had lower transferrin saturation, which may indicate a reduction in iron transport to tissues (9). Since low ferritin levels have been associated with this SNP, it could be related to low iron status (10). Another important observation was made in a placebo-controlled nutritional intervention study with iron-fortified food in iron-deficient women (17). Dietary iron-fortification markedly increased the iron status in all women. However, carriers of the minor A allele showed *Tf* levels higher than the rest during the 16-week intervention period (18). All of these observations suggest that this SNP may affect iron metabolism.

In conclusion, we found that the A allele of the SNP rs3811647 enhances *Tf* expression compared with the G allele, and that this might explain the association between this SNP and the high serum *Tf* levels observed in different population groups. .

References

1. World Health Organization. Assessing the iron status of populations. Geneva, 2007.
2. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov 4.
3. Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA. Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab*. 2009 Mar;9(3):217-27.
4. Zakin MM, Baron B, Guillou F. Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene. *Dev Neurosci*. 2002;24(2-3):222-6.
5. Idzerda RL, Huebers H, Finch CA, McKnight GS. Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(11):3723-7.
6. Djeha A, Perez-Arellano JL, Hayes SL, Oria R, Simpson RJ, Raja KB, et al. Cytokine-mediated regulation of transferrin synthesis in mouse macrophages and human T lymphocytes. *Blood*. 1995 Feb 15;85(4):1036-42.
7. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8;272(32):20055-62.
8. Whitfield JB, Cullen LM, Jazwinska EC, Powell LW, Heath AC, Zhu G, et al. Effects of HFE C282Y and H63D polymorphisms and polygenic background on iron stores in a large community sample of twins. *Am J Hum Genet*. 2000 Apr;66(4):1246-58.
9. Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, et al. Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. *Nutr Metab (Lond)*. 2011;8:69.
10. Benyamin B, McRae AF, Zhu G, Gordon S, Henders AK, Palotie A, et al. Variants in TF and HFE explain approximately 40% of genetic variation in serum-transferrin levels. *Am J Hum Genet*. 2009 Jan;84(1):60-5.
11. Benyamin B, Ferreira MA, Willemsen G, Gordon S, Middelberg RP, McEvoy BP, et al. Common variants in Tmprss6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nat Genet*. 2009 Nov;41(11):1173-5.

12. McLaren CE, Garner CP, Constantine CC, McLachlan S, Vulpe CD, Snively BM, et al. Genome-wide association study identifies genetic Loci associated with iron deficiency. *PLoS One*. 2011;6(3):e17390.
13. Constantine CC, Anderson GJ, Vulpe CD, McLaren CE, Bahlo M, Yeap HL, et al. A novel association between a SNP in CYBRD1 and serum ferritin levels in a cohort study of HFE hereditary haemochromatosis. *Br J Haematol*. 2009 Oct;147(1):140-9.
14. Sawaya BE, Aunis D, Schaeffer E. Distinct positive and negative regulatory elements control neuronal and hepatic transcription of the human transferrin gene. *J Neurosci Res*. 1996 Feb 1;43(3):261-72.
15. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002 May;3(5):391-7.
16. Schrem H, Klempnauer J, Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev*. 2002 Mar;54(1):129-58.
17. Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP. Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr*. 2011 Jun;105(11):1652-9.
18. Blanco-Rojo R, Pérez-Granados AM, López-Parra AM, Baeza C, Toxqui L, Arroyo-Pardo E, et al. Influence of SNP rs3811647 on Fe metabolism and response to an Fe supplemented food in menstruating women. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011;70(OCE4):E212.

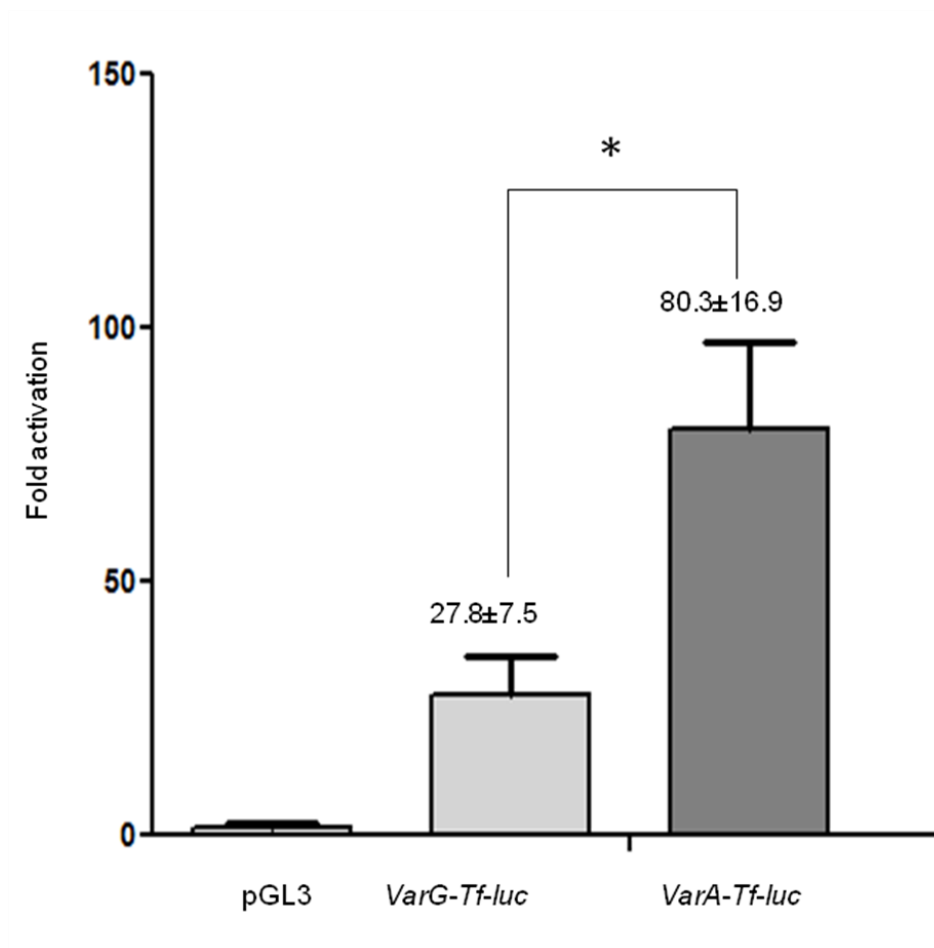


Figure 1. SNP rs3811647 luciferase assay. Hep3B cells were transfected with *VarA-Tf-luc* or *VarG-Tf-luc* constructs; pGL3 (Promoter) vector backbone was used as negative control. Data were normalized to the expression levels of β -galactosidase internal control, and represent the means of two independent experiments (\pm SEM), * p <0.05.

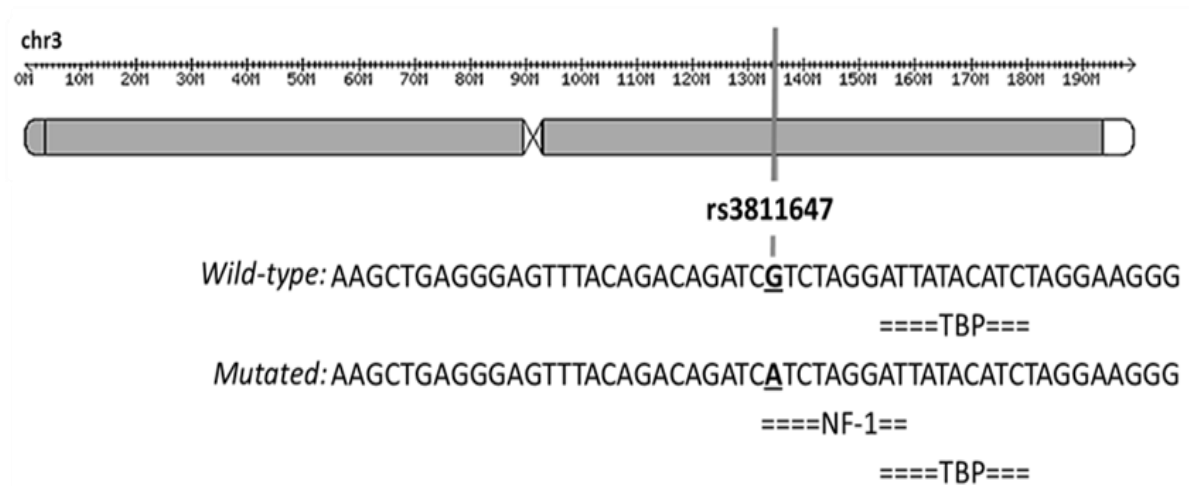


Figure 2. Genomic arrangement (upper panel) and sequences proximal to SNP rs3811647 (bold letter, lower panel). The G allele is shown as wild-type and the minor A allele is shown as the mutated form. Sequence analysis with prediction algorithms showed that the A allele in rs3811647 might create a binding site for the transcription factor Nuclear Factor-1 (NF-1).

3. LA INGESTA DE CARNE ROJA PERO NO DE CARNE BLANCA O DE PRODUCTOS CÁRNICOS SE ASOCIA CON MAYORES ALMACENES DE HIERRO EN MUJERES ESPAÑOLAS EN EDAD FÉRTIL

Nutrition (2012), en trámite.

Objetivo: Los principales factores de riesgo de anemia ferropénica, un problema mundial de salud, son la ingesta inadecuada de hierro y su baja biodisponibilidad. El objetivo del presente estudio fue conocer si existía una relación entre el estado de hierro y la ingesta de alimentos y nutrientes en un grupo de mujeres españolas en edad fértil.

Metodología: Un grupo de 124 mujeres en edad fértil con antecedentes de anemia por deficiencia de hierro participaron en el estudio. La ingesta dietética se evaluó mediante un registro detallado de alimentos de 72 horas. Se determinaron: lípidos en sangre, glucosa sérica y parámetros de hierro (ferritina, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, transferrina, hierro sérico, saturación de transferrina, zinc protoporfirina, receptor soluble de la transferrina, índice de distribución de hematíes y *body iron*). Se separaron las voluntarias en tertiles según los niveles de ferritina sérica y se compararon las posibles diferencias en la ingesta de energía y nutrientes y en los valores hematológicos y bioquímicos mediante ANOVA.

Resultados: No hubo diferencias entre los tertiles de ferritina sérica en la ingesta de alimentos, energía o nutrientes excepto en la ingesta total de carne y la ingesta de hierro hemo, que fueron superiores en el tercil con los valores más altos de ferritina (tercil 3). El consumo de carne roja fue significativamente superior en el tercil 3, mientras en el tercil 1 la ingesta de productos cárnicos resultó significativamente mayor al compararla con los otros dos tertiles. No hubo diferencias en el índice de masa corporal, presión arterial, glucosa y lípidos séricos ni en los índices de riesgo cardiovascular entre tertiles.

Conclusión: El hierro hemo, altamente biodisponible es el principal factor que contribuye al estado de hierro, mientras que la ingesta total de hierro no ejerce ningún efecto. El consumo de carne roja, pero no el de carne blanca o el de productos cárnicos, se asocia con un incremento de los almacenes de hierro, sin que se produzca un aumento del riesgo cardiovascular en este grupo de población.

Palabras clave: ferritina sérica, anemia por deficiencia de hierro, hierro hemo, carne roja, lípidos séricos, mujeres en edad fértil

Red meat but not white or processed meat intake is associated with increased iron stores in menstruating Spanish women

Ruth Blanco-Rojo DS, Laura Toxqui DS, Ione Wright DS, Ana M Pérez-Granados PhD, MP Vaquero PhD.

Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

Corresponding author: MP Vaquero, mpvaquero@ictan.csic.es; Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/ José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

Tel: +34 915492300; Fax: +34 915943627.

Running head: Red meat and iron stores in menstruating women

Word count: 4679 words; 5 tables and 1 figure

Abstract

Objective: The main risk factors for iron deficiency anaemia, a worldwide health problem, include low iron intake and low iron bioavailability. The aim of this study was to know whether there is a relationship between iron status and the intake of food and nutrients in a group of menstruating Spanish women.

Methods: A group of 124 menstruating women with antecedents of iron deficiency anaemia participated in the study. Dietary intake was assessed by a 72-h detailed dietary intake report. Blood lipids, glucose and iron parameters (serum ferritin, haemoglobin, haematocrit, mean corpuscular volume, transferrin, serum iron, transferrin saturation, zinc protoporphyrin, soluble transferrin receptor, red blood cell distribution width and body iron) were determined. Serum ferritin levels were separated into tertiles and differences in food and nutrient intakes and haematological and biochemical parameters were determined by ANOVA.

Results: There were no significant differences between tertiles in food, energy or nutrient intakes except for total meat and haem-iron intakes, which increase with tertiles. Red meat consumption was significantly higher in tertile-3 whereas processed meat intake was significantly higher in tertile-1, compared to the other tertiles. There were no differences in body mass index, blood pressure, serum glucose, serum lipids and cardiovascular risk indexes between tertiles.

Conclusion: Haem-iron, highly bioavailable, is the main dietary factor contributing to iron status; total iron intake exerted a negligible effect. Consumption of red meat but not white or processed meat is associated with increased iron stores without increasing the risk of CVD in this population group.

Key words: serum ferritin, iron deficiency anaemia, haem iron, red meat, serum lipids, menstruating women.

Introduction

Iron deficiency anaemia is one of the most common and intractable nutritional problems in the world today, and has important consequences for human health. The World Health Organization estimates that one billion people suffer from it, especially women of childbearing age and children (1). The main risk factors for iron deficiency include a low intake of iron, low iron bioavailability, and/or a period of life when iron requirements are especially high (2).

It is well known that the bioavailability of non-haem iron, the main source of iron from a Western diet (85-90%), is affected by the presence of several dietary components; whereas haem-iron, estimated to contribute 10-15% of total iron intake, is absorbed more efficiently (3). Single-meal studies have shown that non-haem iron absorption is enhanced principally by the presence of animal tissue and ascorbic acid (4-7). On the contrary, phytic acid and polyphenols, found in vegetables, fruit, some cereals and legumes, tea, coffee, and wine, are the main inhibitors of non-haem iron absorption (8, 9). Calcium is the only nutrient that has been described as an inhibitor of haem-iron, although its role in iron bioavailability remains unclear (10). Besides dietary factors, the iron status of the individual influences the absorption of non-haem iron, and there is an inverse correlation between serum ferritin levels and iron absorption (11, 12).

Most studies on iron bioavailability have been performed as single-meal or short-term studies, and information regarding the impact of the habitual diet on iron status is scarce and inconsistent, especially for menstruating women, a population group at risk of iron deficiency anaemia (13). Reports regarding the effect of dietary habits on body iron status in young women present different results. Some of them found significant positive correlation between total iron

intake and iron status (14, 15), whereas others failed to find such a relationship (16, 17). A reason for this may be that food is consumed in many different combinations, which can be decisive for iron bioavailability, and depend on the culture and the food habits of the population studied.

Taking into account that there are few data on diet and iron status in the Spanish population, the aim of the present study was to know if there is a relationship between iron status and the intake of food and nutrients in a group of Spanish menstruating women.

Subjects and methods

Subjects

A group of 124 healthy menstruating women, aged 18-35 years, with iron deficiency anaemia antecedents (familiar and/or individual), non-smoker, non-pregnant, non-breastfeeding participated in the study. Subjects were excluded from the study if they had amenorrhea, menopause, iron deficiency anaemia, thalassaemia, haemochromatosis, chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn disease, gastric ulcers, celiac disease, haemorrhagic diseases), or renal disease, blood donors and women who regularly consume iron supplements.

The participants signed a written informed consent to a protocol approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Madrid and the Spanish National Research Council Committee, Madrid, Spain.

Dietary control and anthropometric measures

Each subject's dietary intake was assessed by a 72-h detailed dietary intake report (3 consecutive working days including one holiday), previously validated and proved valuable to assess nutrient and food intakes (18, 19). The volunteers were instructed to specify the types of food consumed and the serving weights. Daily food, energy intake, nutrient intake and energy provided by macronutrients were calculated with a computer application using the Spanish Food Composition Database (20). Haem iron was assumed to constitute 40% of total from meat and fish (21). The remaining total iron intake was assumed to be non-haem iron. Meat and meat products intake was divided into red meat (including beef, lamb, veal and pork), white meat (including chicken and turkey) and processed meat (including cured and smoked meats, ham, bacon, sausages, chorizo, salami, etc). Total grams of red, white and processed meat were calculated taking into account both fresh cuts and meat consumed as part of a composite meal.

Anthropometric measures were taken using standardised procedures. Body weight was measured with a calibrated Seca scale (to a precision of 100 g) and height was measured with a stadiometer incorporated into the scale. Body mass index (BMI) was calculated as weight/height squared (kg/m^2). Systolic and diastolic blood pressure was measured with a validated digital automated blood pressure monitor (OMROM M6, Omrom Health Care Co., Ltd, Kyoto, Japan).

Blood sampling and biochemical assays

Blood samples were collected by venipuncture after a 12-h fasting period, between 08:00 h and 09:00 h. Serum and plasma were obtained after centrifugation at 1000 g for 15 minutes and stored at -80°C.

Haematocrit, mean corpuscular volume (MCV) haemoglobin and red blood cell distribution width (RDW) were determined following standard laboratory techniques using the Symex NE 9100 automated haematology analyser (Symex, Kobe, Japan). Serum iron, serum ferritin and serum transferrin were determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyser (Roche, Basel, Switzerland). Transferrin saturation (%) was calculated as follows: serum iron ($\mu\text{mol/L}$)/TIBC ($\mu\text{mol/L}$) \times 100, where TIBC is total iron binding capacity, calculated as $25.1 \times$ transferrin (g/L). Body iron was calculated as follows: body iron (mg/kg) = $-\left[\log (\text{serum transferrin receptor} / \text{serum ferritin}) - 2.8229\right] / 0.1207$ (22).

Serum soluble transferrin receptor (sTfR) concentration was determined using an enzyme immunoassay technique (sTfR Human ELISA; Biovendor, Heidelberg, Germany) and erythrocyte zinc protoporphyrin (ZnPP) by haematofluorophotometry (haematofluorophotometer AVIV 206; Izasa, Barcelona, Spain). Values of ZnPP mg/mg Hb were converted to mmol/mol haem of erythrocyte protoporphyrin by using a factor of 25.76.

Serum triacylglycerols, glucose, total cholesterol (T-chol), HDL cholesterol (HDL-chol) and LDL cholesterol (LDL-chol) were determined by an automatic analyser (RA 2000; Technicon). The cardiovascular (CVD) risk indexes were calculated as T-chol/HDL-chol and LDL-chol/HDL-chol ratios.

All determinations except the transferrin receptor were subjected to the ISO 9001-2000 requirement; the intraassay coefficient of variation (CV) of this determination was 3.5% and the inter-assay CV was 4.3%.

Statistical analysis

Data are presented as means with their standard deviations. Serum ferritin and serum triacylglycerol values were log-transformed for statistical testing and serum ferritin levels were separated into tertiles. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare iron biomarkers, food and energy and nutrients intake according to the tertiles of serum ferritin. Where statistically different effects were found ($P < 0.05$), comparisons of mean nutrient intakes were made using the Bonferroni post hoc multiple comparison test. Linear regression models were performed between serum ferritin (log-transformed) and total iron and haem-iron intake. Data were analysed using the SPSS statistical package for Windows (version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

The age of the participating women was 24.3 ± 4.8 years (mean \pm SD) and all volunteers except one were omnivorous. The volunteers were divided according to their serum ferritin (ng/ml) into tertiles [median (intertertil range)]: T1, 9.7 (5.5-14.9); T2, 22.0 (15.1-32.0) and T3, 43.8 (32.1-83.7).

Table 1 shows the iron biomarkers of the volunteers according to ferritin tertiles. Women within the lowest ferritin tertile (T1) showed significantly lower levels of haemoglobin, haematocrit, MCV, serum iron, transferrin saturation, zinc protoporphyrin, RDW and higher levels of transferrin and sTfR

compared to those of tertiles T2 and T3, with no significant differences between T2 and T3. Body iron was significantly lower in the volunteers within T1 than those in T2 and T3, with significant differences between all three tertiles.

There were no significant differences between tertiles in consumption of cereals, legumes, vegetables, fruits and nuts, milk and dairy products, fish, eggs, sugars and sweets or oils and fats (Table 2). Total meat intake did vary depending on tertile ($p=0.04$), although the differences between pairs of tertiles were not significant.

Table 3 shows the differences between tertiles in red, white and processed meat intake. The amount of red meat and white meat consumed (g/day) increased significantly with increasing tertiles ($p=0.008$ and $p=0.05$ respectively). The amount of processed meat (g/day) was lower in T3 compared to the other tertiles, although not significantly. Regarding white meat consumption as a % of total meat intake, no differences were found between tertiles. The percentage of red meat intake from total meat was significantly higher in T3 than in T2 ($p=0.04$) whereas the percentage of processed meat was significantly higher in T1 than in T3 ($p=0.003$).

Regarding energy and nutrient intake (Table 4), there were no differences between tertiles in energy, proteins, carbohydrates, lipids, dietary fibre, calcium, vitamin C, saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), polyunsaturated fatty acids (PUFA) or total iron intakes. However, consumption of haem iron, in mg/day and as % of total iron, was significantly higher for volunteers within T3 than those in T1 ($p=0.04$ and $p=0.01$ respectively).

Table 5 presents body mass index (BMI), blood pressure, glucose and serum lipids of the volunteers according to ferritin tertiles. BMI increases with increasing tertiles and the differences were marginally significant ($p < 0.06$). There were no significant differences in blood pressure, serum triacylglycerol, glucose, T-chol, HDL-chol, LDL-chol, or the two cardiovascular disease indexes: T-chol/HDL-chol and LDL-chol/HDL-chol.

Linear regression showed that haem iron intake explains 9.5% of the variation in ferritin levels ($p = 0.001$ and $R^2 = 0.095$). However there was no linear relationship between total iron intake and ferritin levels (Figure 1).

Discussion

The present study found a direct relationship between haem-iron intake, but not total iron intake and iron stores in Spanish menstruating women, and to our knowledge this is the first report to study the differences in dietary patterns of a group of women based on their iron storage levels.

This group of menstruating women was recruited assuming iron deficiency anaemia antecedent (familiar and/or individual). Women in the first tertile of serum ferritin were in a situation of iron deficient erythropoiesis (IDE), presenting ferritin levels below 15 ng/mL, accompanied by mean values of transferrin saturation $< 15\%$ and zinc protoporphyrin $> 70 \mu\text{mol/mol}$ haem (1, 23). Women within T2 presented ferritin levels corresponding to low iron stores ($< 32 \text{ ng/mL}$) (24) while those of T3 were iron sufficient.

Mean total iron intake in this study is in agreement with other data obtained in Spanish women (25, 26) but is higher than data obtained from other European countries (17, 27). Controversy exists about how to evaluate the adequacy of

iron intake in menstruating women. The use of the Estimated Adequate Requirement (EAR) cut-point method is not recommended, since iron requirements in this population of young women are skewed due to menstruation (28). On the other hand, the Recommended Dietary Allowance (RDA) for this population group (18 mg/day) (29), which is the value to be used as a goal for the daily intake of an individual, is not easily reached by menstruating women, even in dietary interventions that aim to increase dietary iron. Our research group observed in an interventional study that young women who consumed five portions of red meat and two portions of poultry per week had a daily iron intake of 14-15 mg, and it seems difficult to further increase iron intake in a balanced diet (30). Tetens et al observed that total iron intake of women who consumed 150 g of meat per day was only 11 mg/day (31). Moreover, there is no agreement on the recommended iron intake for menstruating women, and the RDAs proposed by various Nutrition Societies and the World Health Organization differ greatly (32). In this regard, present European recommendations are under review (33). In the present study, it is remarkable that the mean total dietary iron intake of the 3 tertiles was similar although iron status varied markedly. There were no differences in nutrient intake between tertiles, except for haem iron, which was significantly lower in women with lower iron status. This result agrees with previous observations from studies that compared iron status and nutrient intake in vegetarian versus omnivore women, which found no difference in total iron intake but higher iron storage in omnivores (34-36). Although haem iron intake in these studies was not calculated, we can assume that it is negligible in vegetarians. These results are not surprising taking into account the high bioavailability of haem iron, which is not affected by other dietary compounds

(3). Nevertheless, few of the studies that aimed to know if dietary habits affect iron status in menstruating women determined haem iron intake, and the results obtained were controversial. In agreement with our findings, Galan et al observed a relationship between serum ferritin and haem iron intake in French menstruating women who consumed 1.1 mg haem iron/day (14), whereas a study in Belgium women and another in Japanese women did not find this association (16, 17). This could be explained by the fact that mean haem iron intakes in Belgium and Japanese women were lower than in our volunteers, 0.6 mg/day and 0.24 mg/1000 kcal respectively, and these low amounts could be insufficient to influence iron status.

Regarding food consumption, we only found a slight difference in total meat intake between the tertiles. However, the study of the type of meat that these women consumed revealed that the women who had higher red meat intake also had higher ferritin and body iron, indicating better iron status. On the contrary, white and processed meat intakes seem not to enhance iron stores. These results make sense in terms of white meat consumption, as this type of meat contains very low amounts of iron, but the fact that processed meat had little influence on iron stores is an unexpected finding, since processed meat products usually come from red meat. This is particularly interesting given that women with IDE consumed nearly 50 g per day of processed meat. A possible explanation for this lack of influence could be that the haem iron content of this type of meat is overestimated. Processed meat products normally contain ingredients from cereals that can contribute greatly to total iron content of the product. The calculation that 40% of total iron of these products is haem iron would therefore be erroneous as up to 50% of the total iron may be of plant origin and therefore, the women in T1 may have lower

haem iron intake. To our knowledge, this is the first report that has studied the influence on iron status of red, white and processed meat separately, since other reports studied the influence of total meat intake, or the influence of red and processed meat versus white meat consumption on iron status (37, 38).

Total meat consumption in this group agrees with other findings obtained in Spanish women (19, 39). Regarding types of meat consumed, dietary trends of T3 were more similar to Spanish women of a similar age (39). The population at large has been advised to reduce consumption of red and processed meat, since it has been associated with negative effects on health. Red meat has been associated with an increase in cardiovascular disease (CVD) in several studies (40-42) although the majority are considered to be inconsistent (43). Stronger evidence is available from studies that investigated dietary patterns rather than meat consumption in relation to risk of CVD (44, 45). Also, epidemiological studies that have associated meat intake with an increased risk of colon cancer (46), although the proposed carcinogenicity of meat has been related to the type of meat consumed being processed meat consumption which carries a higher risk, the method of cooking and the individual genetic risk (47).

Despite these facts, we found that the increased red meat consumption was beneficial in this group of women. Although energy obtained from fat intake was higher than recommended, most of it was from monounsaturated fatty acids, and can be compatible with a Mediterranean style diet (48). This circumstance, as well as the fact that these women were non-smokers, normal-weight and normotensive, and have a higher fruit and vegetable consumption than Spanish women of the same mean age (39), suggest that they had a low CVD risk. In fact, blood lipids, glucose and CVD indexes were

within the normal range, and there were no significant differences between tertiles. Moreover, the red meat intake in women in T3 was below the limits proposed by the World Cancer Research Fund International (<71 g/d), and they also had the lowest intake of processed meat. Moreover, in Spanish dietary habits, meat is not normally cooked over an open flame (barbecuing). Taking these factors into account, the associated risk of cancer development from a high red meat intake is reduced in this group of women.

Another important issue is that not only diet, but other factors, such as physiology and genetics, can contribute to the development of iron deficiency. For women, menstruating blood loss has been reported to be one of the most important predictors of iron deficiency anaemia risk (49). However, in our volunteers, no significant differences were obtained in menstrual blood losses between tertiles (data not shown). Regarding genetic factors, our research group reported that not only genetic variants can influence the development of iron deficiency (50), but can also affect iron status recovery (51).

Conclusion

The prevalence of iron deficiency in this group of Spanish menstruating women is high. According to our results, the consumption of haem iron, highly bioavailable, is the main dietary factor contributing to iron status whilst total iron intake exerted negligible effect. We also found that consumption of red meat but not white or processed meat is associated with increased iron stores without increasing CVD risk biomarkers in this population group. Therefore, frequent consumption of red meat in populations at risk of iron deficiency

anaemia, such as menstruating women, could be promoted in the context of a healthy diet.

Further studies should be done in order to increase knowledge of iron deficiency anaemia aetiology, given that mechanism of iron metabolisms regulation remains unclear, information regarding the impact of cooking and gene-diet interaction is scarce and this anaemia is often associated with other metabolic alterations.

Acknowledgements

The authors are grateful to I. Vazquez, M Chocano, M Paramés and R. Navarro for helping with dietary calculation. This study was supported by Project AGL2009-11437 and Grupo Leche Pascual. R.Blanco-Rojo and L. Toxqui were supported by a JAE-predoc grant from CSIC and European Social Found.

References

1. World Health Organization. Assessing the iron status of populations. Geneva 2007
2. Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet*. 2007;370(9586):511-20.
3. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(5):1461S-7S.
4. Cook JD, Reddy MB. Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(1):93-8.
5. Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP. Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr*. 2011;105(11):1652-9.
6. Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat M, Cook JD. Meat protein fractions enhance nonheme iron absorption in humans. *J Nutr*. 2006;136(11):2808-12.
7. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Carbajal A, Pedrosa MM, Roe MA, et al. Oily fish increases iron bioavailability of a phytate rich meal in young iron deficient women. *J Am Coll Nutr*. 2008;27(1):96-101.
8. Lopez MA, Martos FC. Iron availability: An updated review. *Int J Food Sci Nutr*. 2004;55(8):597-606.
9. Hurrell RF. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. *Int J Vitam Nutr Res*. 2004;74(6):445-52.
10. Lynch SR. The effect of calcium on iron absorption. *Nutr Res Rev*. 2000;13(2):141-58.

11. Moretti D, Zimmermann MB, Wegmuller R, Walczyk T, Zeder C, Hurrell RF. Iron status and food matrix strongly affect the relative bioavailability of ferric pyrophosphate in humans. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(3):632-8.
12. Thankachan P, Walczyk T, Muthayya S, Kurpad AV, Hurrell RF. Iron absorption in young Indian women: the interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):881-6.
13. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO Global Database on Anaemia. Geneva 2008
14. Galan P, Yoon HC, Preziosi P, Viteri F, Valeix P, Fieux B, et al. Determining factors in the iron status of adult women in the SU.VI.MAX study. *Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants. Eur J Clin Nutr.* 1998;52(6):383-8.
15. Cade JE, Moreton JA, O'Hara B, Greenwood DC, Moor J, Burley VJ, et al. Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(4):813-20.
16. Asakura K, Sasaki S, Murakami K, Takahashi Y, Uenishi K, Yamakawa M, et al. Iron intake does not significantly correlate with iron deficiency among young Japanese women: a cross-sectional study. *Public Health Nutr.* 2009;12(9):1373-83.
17. Pynaert I, Delanghe J, Temmerman M, De Henauw S. Iron intake in relation to diet and iron status of young adult women. *Ann Nutr Metab.* 2007;51(2):172-81.
18. de Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, Hautvast JG. Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA Study. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50 Suppl 2:S123-4.
19. Schoppen S, Carbajal A, Perez-Granados AM, Vivas F, Vaquero MP. Food, energy and macronutrient intake of postmenopausal women from a menopause program. *Nutr Hosp.* 2005;20(2):101-9.

-
20. DIAL Alce ingenieria. Available from:
<http://www.alceingenieria.net/nutricion.htm>.
21. Monsen ER, Hallberg L, Layrisse M, Hegsted DM, Cook JD, Mertz W, et al. Estimation of available dietary iron. *Am J Clin Nutr*. 1978;31(1):134-41.
22. Cook JD, Flowers CH, Skikne BS. The quantitative assessment of body iron. *Blood*. 2003;101(9):3359-64.
23. Metzgeroth G, Adelberger V, Dorn-Beineke A, Kuhn C, Schatz M, Maywald O, et al. Soluble transferrin receptor and zinc protoporphyrin--competitors or efficient partners? *Eur J Haematol*. 2005;75(4):309-17.
24. Koulaouzidis A, Cottier R, Bhat S, Said E, Linaker BD, Saeed AA. A ferritin level >50 microg/L is frequently consistent with iron deficiency. *Eur J Intern Med*. 2009;20(2):168-70.
25. Rubio C, Gutierrez AJ, Revert C, Reguera JI, Burgos A, Hardisson A. Daily dietary intake of iron, copper, zinc and manganese in a Spanish population. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60(7):590-600.
26. Rodriguez-Rodriguez E, Lopez-Sobaler AM, Andres P, Aparicio A, Navia B, Ortega RM. Modification of iron status in young overweight/mildly obese women by two dietary interventions designed to achieve weight loss. *Ann Nutr Metab*. 2007;51(4):367-73.
27. Fairweather-Tait SJ. Iron nutrition in the UK: getting the balance right. *Proc Nutr Soc*. 2004;63(4):519-28.
28. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assesment. Washington2000

29. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington DC.2001
30. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP. Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem.* 2009;65(2):165-74.
31. Tetens I, Bendtsen KM, Henriksen M, Ersboll AK, Milman N. The impact of a meat- versus a vegetable-based diet on iron status in women of childbearing age with small iron stores. *Eur J Nutr.* 2007;46(8):439-45.
32. Cuervo M, Corbalan M, Baladia E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C, et al. Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp.* 2009;24(4):384-414.
33. Cavelaars AE, Doets EL, Dhonukshe-Rutten RA, Hermoso M, Fairweather-Tait SJ, Koletzko B, et al. Prioritizing micronutrients for the purpose of reviewing their requirements: a protocol developed by EURRECA. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64 Suppl 2:S19-30.
34. Ball MJ, Bartlett MA. Dietary intake and iron status of Australian vegetarian women. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(3):353-8.
35. Reddy S, Sanders TA. Haematological studies on pre-menopausal Indian and Caucasian vegetarians compared with Caucasian omnivores. *Br J Nutr.* 1990;64(2):331-8.
36. Alexander D, Ball MJ, Mann J. Nutrient intake and haematological status of vegetarians and age-sex matched omnivores. *Eur J Clin Nutr.* 1994;48(8):538-46.

-
37. Ortega RM, Lopez-Sobaler AM, Requejo AM, Quintas ME, Gaspar MJ, Andres P, et al. The influence of meat consumption on dietary data, iron status and serum lipid parameters in young women. *Int J Vitam Nutr Res*. 1998;68(4):255-62.
38. Gibson S, Ashwell M. The association between red and processed meat consumption and iron intakes and status among British adults. *Public Health Nutr*. 2003;6(4):341-50.
39. Ribas-Barba L, Serra-Majem L, Salvador G, Castell C, Cabezas C, Salleras L, et al. Trends in dietary habits and food consumption in Catalonia, Spain (1992-2003). *Public Health Nutr*. 2007;10(11A):1340-53.
40. Steffen LM, Kroenke CH, Yu X, Pereira MA, Slattery ML, Van Horn L, et al. Associations of plant food, dairy product, and meat intakes with 15-y incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(6):1169-77; quiz 363-4.
41. Kelemen LE, Kushi LH, Jacobs DR, Jr., Cerhan JR. Associations of dietary protein with disease and mortality in a prospective study of postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. 2005;161(3):239-49.
42. Kontogianni MD, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoschoou C, Stefanadis C. Relationship between meat intake and the development of acute coronary syndromes: the CARDIO2000 case-control study. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(2):171-7.
43. McAfee AJ, McSorley EM, Cuskelly GJ, Moss BW, Wallace JM, Bonham MP, et al. Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Sci*. 2010;84(1):1-13.

44. Heidemann C, Schulze MB, Franco OH, van Dam RM, Mantzoros CS, Hu FB. Dietary patterns and risk of mortality from cardiovascular disease, cancer, and all causes in a prospective cohort of women. *Circulation*. 2008;118(3):230-7.
45. Iqbal R, Anand S, Ounpuu S, Islam S, Zhang X, Rangarajan S, et al. Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the INTERHEART study. *Circulation*. 2008;118(19):1929-37.
46. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: A global perspective. Washington D.C. 2007
47. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2657-64.
48. Serra-Majem L, Aranceta J. Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías alimentarias para la población Española. Madrid 2001
49. Harvey LJ, Armah CN, Dainty JR, Foxall RJ, John Lewis D, Langford NJ, et al. Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK. *Br J Nutr*. 2005;94(4):557-64.
50. Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, et al. Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. *Nutr Metab (Lond)*. 2011;8:69.
51. Blanco-Rojo R, Pérez-Granados AM, López-Parra AM, Baeza C, Toxqui L, Arroyo-Pardo E, et al. Influence of SNP rs3811647 on Fe metabolism and response to an Fe supplemented food in menstruating women. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011;70(OCE4):E212.

Table 1. Iron biomarkers according to ferritin tertiles

	T1	T2	T3
n	41	42	41
Haemoglobin (g/dl)	12.8±1.0 ^a	13.4±0.8 ^b	13.4±0.8 ^b
Haematocrit (%)	38.0±2.8 ^a	39.7±2.8 ^b	39.7±2.6 ^b
Mean corpuscular volume (fl.)	83.9±5.2 ^a	88.7±3.5 ^b	88.3±4.4 ^b
Transferrin (mg/dl)	353.4±58.1 ^a	308.2±49.8 ^b	280.7±50.4 ^b
Serum iron (µg/dl)	63.0±31.6 ^a	98.0±42.5 ^b	87.5±30.5 ^b
Transferrin saturation (%)	13.3±7.8 ^a	22.9±9.3 ^b	22.3±8.1 ^b
Zinc protoporphyrin (µmol/mol haem)	70.9±25.5 ^a	55.6±17.9 ^b	53.6±14.7 ^b
Soluble transferrin receptor (mg/l)	1.8±0.6 ^a	1.3±0.4 ^b	1.2±0.3 ^b
Red blood cell distribution width (%)	13.7±1.4 ^a	12.6±0.5 ^b	12.3±0.5 ^b
Body iron (mg/Kg)	4.6±1.8 ^a	8.7±1.5 ^b	11.8±1.2 ^c

Data are mean±SD. Differences between tertiles were highly significant for all parameters ($p \leq 0.001$, ANOVA). Different letters show differences between tertiles (Bonferroni)

Table 2. Food groups intake according to ferritin tertiles

	T1	T2	T3	ANOVA
Cereals (g/d)	173.1±67.1	185.5±84.1	178.6±68.1	NS
Legumes(g/d)	8.7±17.6	12.3±18.8	8.3±15.0	NS
Vegetables(g/d)	229.7±82.9	214.9±121.5	231.0±118.8	NS
Fruits and nuts(g/d)	206.3±193.0	210.0±147.0	184.9±143.4	NS
Milk and dairy products (g/d)	404.4±157.9	406.7±208.5	368.2±181.9	NS
Meat and meat products (g/d)	103.2±59.5	136.2±72.3	138.6±79.2	P=0.04
Fish(g/d)	51.0±43.0	39.9±34.1	36.5±40.9	NS
Eggs (g/d)	22.9±23.0	25.5±16.6	21.0±19.3	NS
Sugars and sweets (g/d)	29.8±29.9	28.5±24.5	26.3±19.9	NS
Oils and fats(g/d)	33.4±22.9	35.2±20.4	37.1±22.2	NS

Data are mean±SD.

Table 3. Types of meat according to ferritin tertiles

	T1	T2	T3	ANOVA
Red meat				
g/d	35.8±29.6 ^a	41.3±36.7 ^a	63.3±38.7 ^b	0.008
% of total meat intake	34.7±28.7 ^{ab}	30.3±26.9 ^a	45.7±27.9 ^b	0.04
White meat				
g/d	22.4±25.1 ^a	42.1±39.3 ^b	39.4±40.6 ^{ab}	0.05
% of total meat intake	21.7±24.4	30.9±28.8	28.5±29.3	NS
Processed meat				
g/d	45.8±32.8	49.1±38.9	31.4±31.7	NS(0.06)
% of total meat intake	44.4±31.8 ^a	36.1±28.6 ^{ab}	22.6±22.9 ^b	0.003

Data are mean±SD. Different letters show differences between tertiles (Bonferroni)

Table 4. Energy and nutrients intakes according to ferritin tertiles

	T1	T2	T3	ANOVA
Energy (Kcal/d)	2137±482	2172±745	2274±561	NS
Proteins (% energy/d)	15.8±4.7	16.1±5.3	15.2±4.1	NS
Carbohydrates (% energy/d)	39.5±11.4	40.0±15.0	38.1±10.4	NS
Lipids (% energy/d)	39.0±11.3	40.2±13.9	40.9±14.0	NS
Dietary fibre (g/d)	19.6±7.3	20.7±8.5	19.4±5.8	NS
Calcium (mg/d)	975.6±325.1	1045.4±412.8	952.1±353.5	NS
Total iron (mg/d)	13.9±4.8	15.5±6.8	13.9±4.2	NS
Haem iron (mg/d)	1.0±0.6 ^a	1.2±0.6 ^{ab}	1.3±0.7 ^b	P=0.04
Haem iron (% of total iron)	7.2±4.0 ^a	7.8±4.0 ^{ab}	9.8±4.2 ^b	P=0.01
Vitamin C (mg/d)	128.6±62.7	129.1±66.8	139.3±58.9	NS
SFA (% energy/d)	12.7±4.0	13.2±5.1	12.8±4.6	NS
MUFA (% energy/d)	16.5±5.4	17.8±6.4	18.3±7.6	NS
PUFA (% energy/d)	5.0±1.7	5.4±2.2	4.9±1.7	NS

Data are mean±SD. Different letters show differences between tertiles (Bonferroni).

Table 5. Body mass index (BMI) and serum lipids according to ferritin tertiles

	T1	T2	T3
BMI (kg/m ²)	21.3±1.9	21.6±2.3	22.4±2.5
Systolic blood pressure (mmHg)	106.4±12.1	104.3±11.0	103.8±19.4
Diastolic blood pressure (mmHg)	65.9±9.2	64.7±9.7	66.9±10.7
TAG (mg/dL)	71.7±27.8	72.0±31.4	78.3±47.4
Glucose (mg/dL)	90.1±5.8	90.6±6.5	89.3±5.4
Total cholesterol (mg/dL)	195.1±33.7	189.8±36.2	190.2±28.2
HDL-cholesterol (mg /dL)	74.4±14.3	73.7±12.5	69.4±15.3
LDL cholesterol (mg/dL)	109.3±28.0	104.6±31.0	108.0±22.8
T-chol/HDL-chol	2.7±0.6	2.6±0.5	2.8±0.5
LDL-chol/HDL-chol	1.5±0.5	1.4±0.5	1.6±0.5

Data are mean±SD. Differences between tertiles were not significant.

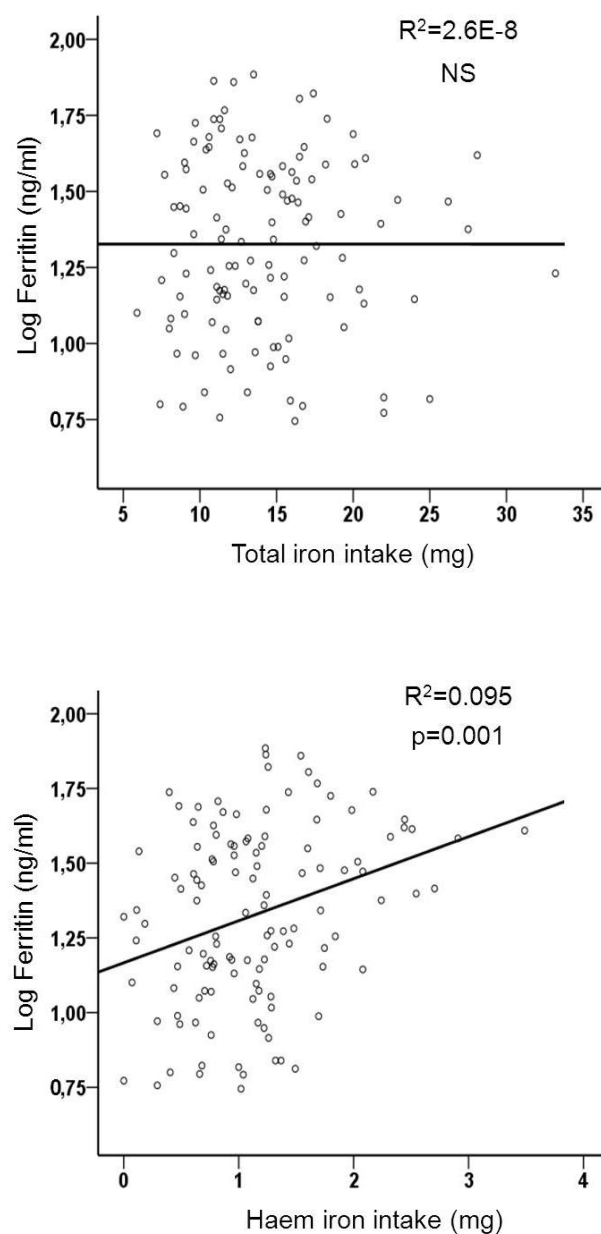


Figure 1. Linear regressions between Log-ferritin levels and total iron intake (mg) and log-ferritin levels and haem iron intake (mg). Total iron intake was not related with serum ferritin levels whereas haem iron intake was associated with serum ferritin ($p=0.001$, $R^2=0.095$).

4. EFICACIA DE UN ZUMO DE FRUTAS FORTIFICADO CON PIROFOSFATO FÉRRICO MICROENCAPSULADO: ESTUDIO ALEATORIZADO, DOBLE CIEGO, CONTROLADO POR PLACEBO EN MUJERES ESPAÑOLAS CON DEFICIENCIA DE HIERRO.

British Journal of Nutrition (2011), 105: 1652-1659.

La anemia por deficiencia de hierro es un problema de salud a nivel mundial. Hemos estudiado la influencia de consumir un zumo de frutas fortificado con hierro sobre el estado de hierro en mujeres en edad fértil. Para ello se llevó a cabo un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo de 16 semanas de duración. Las voluntarias participantes fueron divididas al azar en dos grupos: el grupo P (n=58) o el grupo F (n=64) y consumieron, como suplemento de su dieta habitual, 500 mL/día de un zumo placebo o fortificado con hierro, respectivamente. El zumo de frutas fortificado con hierro contenía pirofosfato férrico encapsulado y aportaba 18 mg de Fe al día (100% de la RDA). En el punto basal y una vez al mes se determinaron la ingesta dietética, el peso corporal y los siguientes parámetros del metabolismo del hierro: número de eritrocitos, hematocrito, volumen corpuscular medio, índice de distribución de hematíes, hemoglobina, hierro sérico, ferritina sérica, transferrina, saturación de la transferrina, receptor soluble de la transferrina y zinc protoporfirina. El consumo del zumo de fruta, tanto el placebo como el fortificado, supuso un incremento de la ingesta de hidratos de carbono y vitamina C y un ligero aumento del índice de masa corporal dentro de los límites normales. Desde la cuarta semana se apreció un incremento significativo de los niveles de ferritina sérica en el grupo F ($p<0.05$), los cuales llegaron a ser un 80% superiores a los del grupo P al alcanzar la semana 16 ($p<0.001$). Los valores en suero de transferrina disminuyeron en el grupo F frente al P tras 4 semanas ($p<0.001$). El índice de distribución de hematíes fue mayor en el grupo F comparado con el P en la 4ª y 8ª semana ($p<0.05$). La saturación de la transferrina se incrementó tras 8 semanas, y el hematocrito, el volumen corpuscular medio y la hemoglobina en la semana 12 en el grupo F frente al P ($p<0.05$). Los valores de hierro sérico no se modificaron. El receptor soluble de la transferrina y la zinc protoporfirina disminuyeron en el grupo F en la semana 16 ($p<0.05$). El zumo de fruta fortificado con pirofosfato férrico mejoró el estado de hierro y podría ser empleado para prevenir el desarrollo de anemia por deficiencia de hierro.

Palabras clave: Fortificación, pirofosfato férrico, anemia por deficiencia de hierro, estado de hierro, mujeres.

Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women

Ruth Blanco-Rojo¹, Ana M. Pérez-Granados¹, Laura Toxqui¹, Carmen González-Vizcayno², Marco A. Delgado³ and M. Pilar Vaquero^{1*}

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain

²Clinical Analysis Laboratory, Madrid Salud, Madrid, Spain

³Grupo Leche Pascual, Aranda de Duero, Burgos, Spain

(Received 12 July 2010 – Revised 29 November 2010 – Accepted 30 November 2010 – First published online 8 February 2011)

Abstract

Fe-deficiency anaemia is a worldwide health problem. We studied the influence of consuming an Fe-fortified fruit juice on Fe status in menstruating women. A randomised, double-blind, placebo-controlled study of 16 weeks of duration was performed. Subjects were randomised into two groups: the P group (*n* 58) or the F group (*n* 64), and consumed, as a supplement to their usual diet, 500 ml/d of a placebo fruit juice or an Fe-fortified fruit juice, respectively. The Fe-fortified fruit juice, containing microencapsulated iron pyrophosphate, provided 18 mg Fe/d (100% of the RDA). At baseline and monthly, dietary intake, body weight and Fe parameters were determined: total erythrocytes, haematocrit, mean corpuscular volume (MCV), red blood cell distribution width (RDW), Hb, serum Fe, serum ferritin, serum transferrin, transferrin saturation, soluble transferrin receptor (sTfR) and zinc protoporphyrin (ZnPP). The fruit juice consumption involved increased intake of carbohydrates and vitamin C, and increased BMI within normal limits. Ferritin was higher in the F group after week 4 ($P < 0.05$) and became 80% higher than in the P group after week 16 ($P < 0.001$), and transferrin decreased in the F group compared with the P group after week 4 ($P < 0.001$). RDW was higher at weeks 4 and 8 in the F group compared with the P group ($P < 0.05$). Transferrin saturation increased after week 8, and haematocrit, MCV and Hb increased after week 12, in the F group compared with the P group. Serum Fe did not change. sTfR and ZnPP decreased in the F group at week 16 ($P < 0.05$). Iron pyrophosphate-fortified fruit juice improves Fe status and may be used to prevent Fe-deficiency anaemia.

Key words: Fortification: Ferric pyrophosphate: Iron-deficiency anaemia: Iron status: Women

Nutritional Fe deficiency has been identified as one of the ten leading factors for disease, disability and death in the world today. An estimated two billion people are affected, and the population at risk includes women of child-bearing age and children. It is the only highly frequent nutritional deficiency in developing and developed countries⁽¹⁾.

Dietary strategies for combating Fe deficiency include Fe supplementation, dietary modification and diversification, and food fortification⁽²⁾. Our research group has recently observed in young women that the current RDA of 18 mg Fe/d^(3,4) was not easily reached, even though the volunteers consumed five portions of red meat and two portions of poultry per week⁽⁵⁾. Supplementation with doses of Fe ≥ 100 mg/d is efficacious to increase Fe status, but its major limitation is

low compliance due to gastrointestinal discomfort⁽²⁾. Finally, fortification is widely considered to be the most practical and cost-effective prevention programme⁽⁶⁾. However, Fe is the most challenging micronutrient to add to foods, because the Fe compounds that have the best bioavailability tend to be those that interact most strongly with food constituents producing undesirable organoleptic changes⁽⁷⁾. Among Fe fortificants, ferric pyrophosphate allows appropriate food processing, and it is easily and effectively absorbed while producing negligible colour and palatability changes^(8–10).

It is well known that the food matrix strongly affects Fe bioavailability⁽¹¹⁾. Therefore, in addition to the Fe salt, the effectiveness of consuming Fe fortificants is highly dependent on the type of food used.

Abbreviations: AA, ascorbic acid; F, fortified group; P, placebo group; RDW, red blood cell distribution width; sTfR, soluble transferrin receptor; ZnPP, zinc protoporphyrin.

*Corresponding author: M. P. Vaquero, fax +34 915943627, email mpvaquero@ictan.csic.es

Ascorbic acid (AA) is the most important enhancer of Fe absorption, both for its ability to improve Fe absorption in the lumen and for overcoming the negative effect of inhibitors^(12–14). However, there are doubts concerning the applicability of single-meal results to the practical diet.

Cook & Reddy⁽¹⁵⁾ studied Fe absorption from three diets varying in AA and concluded that the effect of vitamin C on Fe absorption from a complete diet was far less pronounced than that from single meals. A better Fe status is reached when AA is consumed with meals containing substantial amounts of added Fe^(10,13).

Nevertheless, studies that used foods with a naturally high content of AA are scarce⁽¹⁶⁾. Fruit juices can contain high quantities of vitamin C, low pH and no Fe absorption inhibitors, and should be considered as target products to fortify with Fe.

An orange juice fortified with iron sulphate (2 mg Fe/100 ml) given to Brazilian preschool children during 4 months (mean Fe intake 5.7 mg/d) increased Hb levels and decreased the percentage of anaemic children from 60 to 20%⁽¹⁶⁾. Other studies have been performed using multiple-micronutrient-fortified powdered beverages containing iron bis-glycinate. These beverages reduced the overall prevalence of anaemia in children, adolescent girls and pregnant women of developing countries^(17–21).

The present study therefore aims to investigate the influence of the consumption, as a part of the usual diet, of an Fe-fortified fruit juice on Fe metabolism in young Spanish Fe-deficient women.

This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01135576.

Subjects and methods

The present study was designed and carried out following the statement guidelines of the Consolidated Standards of Reporting Trials⁽²²⁾.

Subjects

Volunteers were recruited by different announcements in the press, university campus and web pages of Madrid. The study was also verbally promoted at public events.

The principal variable for the calculation of sample size was ferritin, with a mean value for the deficient population of 11 (SD 5) ng/ml. It was calculated that a minimum of sixty-three subjects with low Fe stores would be required in each group to demonstrate a difference of 2.5 units in serum ferritin between two treatments at 80% power and confidence level at 95%.

Women aged 18–35 years, non-smoker, non-pregnant, non-breast-feeding, with low Fe stores, defined as serum ferritin <40 ng/ml and Hb \geq 110 g/l, were included in the present study. The cut-off value for serum ferritin was selected because a normal or elevated ferritin value does not exclude the presence of Fe deficiency, and cut-off ranges between 25 and 50 ng/ml are usually considered in studies dealing with predisposition to anaemia^(5,23). Subjects were excluded

from the study if they had amenorrhoea, menopause or any known health problems likely to influence Fe status including Fe metabolism-related diseases (Fe-deficiency anaemia, thalassaemia and haemochromatosis), chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn's disease, gastric ulcers, coeliac disease and haemorrhagic diseases), renal disease or allergy to any of the components of the assay juices. Other exclusion criteria were blood donors or to have regularly consumed Fe or AA supplements within the 4 months before participating in the intervention.

A group of 259 women contacted the research group in order to participate in the study, but only 163 underwent screening. Out of the 163 women, thirty-three were excluded (twenty-eight did not meet the inclusion criteria and five refused to participate). Finally, a total of 130 women agreed to participate in the nutritional intervention. They were randomised into two groups: fortified (F) and placebo (P). All volunteers of the F group completed the assay while eight participants of the P group abandoned the intervention (Fig. 1).

Participating women were instructed not to deviate from their regular habits and to maintain their normal diet and exercise level during the 4 months.

The present study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects/patients were approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Madrid. Written informed consent was obtained from all subjects.

Study design

The study consisted of a randomised double-blind study controlled by placebo of 16 weeks' duration.

The volunteers recruited were randomly allocated into two groups, using the RAND function in Excel (Microsoft Office 2003). One group consumed, as a supplement to their usual diet, 500 ml/d of the Fe-fortified fruit juice (F group, *n* 64), whereas the other consumed 500 ml/d of the placebo fruit juice (P group, *n* 66). Fortified and placebo juices were manufactured in 500 ml cartons and in two different tastes (orange and peach apple) to achieve compliance. The fortified juice supplied 18 mg Fe/500 ml carton, in the form of microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin, equivalent to 100% of the RDA/d^(3,4). All juices were fortified with vitamin C. Nutritional composition of the juices was facilitated by the manufacturer (Grupo Leche Pascual, Burgos, Spain). Orange juices provided (per 100 ml) 188 kJ, 0.6 g of protein, 10.5 g of carbohydrate and 19 mg of vitamin C; the Fe-fortified orange juice provided 3.6 mg of Fe, whereas the placebo juice had 0.084 mg. Peach apple juices provided (per 100 ml) 201 kJ, 0.6 g of protein, 11.3 g of carbohydrate and 19 mg of vitamin C; the Fe-fortified peach apple juice provided 3.6 mg of Fe, whereas the placebo juice had 0.136 mg.

Participants were instructed to alternate between juice flavours (orange juice one day, peach apple juice the next day). The 500 ml carton had to be drunk all at once separately from meals (by at least 2 h) and shaken before consumption.

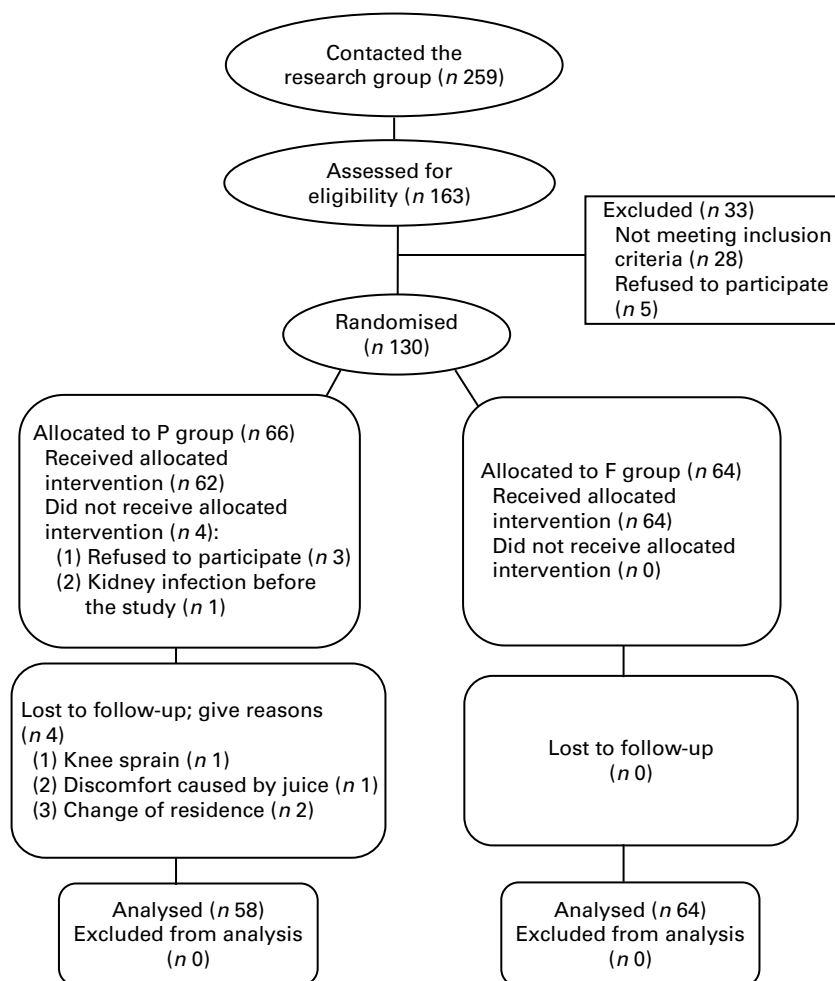


Fig. 1. Diagram of the Consolidated Standards of Reporting Trials.

Volunteers who could not drink the juice one day were instructed to consume two juice cartons the following day.

Dietary control and compliance

Each subject's dietary intake was evaluated at baseline and monthly to control any possible changes in energy and nutrient intakes. They completed a 72 h detailed dietary intake report, previously validated and proved valuable to assess nutrient intake^(24,25), specifying the types of food consumed and serving weights. Daily food, energy intake, nutrient intake and energy provided by macronutrients were calculated by a computer application using the Spanish Food Composition Database⁽²⁶⁾. The compliance of the study was assessed monthly by questionnaires and personal interview when volunteers underwent blood sampling.

Anthropometric, blood pressure and physical activity determinations

Once a month, anthropometric measures were taken using standardised procedures. Body weight was measured with a calibrated Seca scale (to a precision of 100 g), and height

was measured at baseline with a stadiometer incorporated into the scale. Duplicate waist circumference was taken to the nearest 0.1 cm using an inelastic, flexible tape measure. BMI was calculated as weight/height squared (kg/m^2). To avoid inter-examiner variability, one trained member of the research team did all anthropometric determinations. International manual procedures were used⁽²⁷⁾.

Physical activity was assessed by a validated questionnaire after weeks 4 and 12. This questionnaire was completed during face-to-face interviews conducted by a trained dietitian. Women were asked about their occupation, sleeping hours and additional activities at work and during the rest of the day. The physical activity questionnaire included representative values expressed as multiples of resting energy expenditure. Average daily exercise was calculated taking into account the intensity level and time spent on each activity. Activities were divided into five categories and expressed as an activity factor (resting = 1, very light = 1.5, light = 2.5, moderate = 5 and heavy = 7)⁽²⁸⁾.

In addition, every 4 weeks, women completed a questionnaire about physical discomfort or health problems, medication use and changes in their normal routine.

Blood sampling and biochemical assays

Volunteers attended the laboratory facilities at baseline, 4, 8, 12 and 16 weeks. Blood samples were collected by venepuncture after a 12h fasting period. Serum and plasma were obtained after centrifugation at 1000 *g* for 15 min and stored at -80°C .

Total erythrocytes, haematocrit, mean corpuscular volume, red blood cell distribution width (RDW) and Hb were determined following standard laboratory techniques using the Symex NE 9100 automated haematology analyser (Symex, Kobe, Japan). Serum Fe, serum ferritin and serum transferrin were determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyser (Roche, Basel, Switzerland). Total iron-binding capacity (TIBC) and transferrin saturation were calculated as follows:

$$\text{TIBC } (\mu\text{mol/l}) = 25.1 \times \text{transferrin } (\text{g/l}),$$

$$\text{Transferrin saturation} = \text{serum Fe } (\mu\text{mol/l}) / \text{TIBC} \times 100.$$

Serum soluble transferrin receptor (sTfR) concentration was determined using an ELISA technique (sTfR Human ELISA; Biovendor, Heidelberg, Germany) and erythrocyte zinc protoporphyrin (ZnPP) by haematofluorophotometry (haematofluorophotometer AVIV 206; Izasa, Barcelona, Spain). Values of ZnPP $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Hb were converted to $\mu\text{mol/mol}$ haem of erythrocyte protoporphyrin by using a factor of 25.76.

All determinations were subjected to the ISO 9001-2000 requirements, except for the transferrin receptor; the intra-assay CV of this determination was 3.5% and the inter-assay CV was 4.3%.

Statistical analysis

Data are presented as means and standard deviations. A normal distribution of variables was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. Serum ferritin values were log-transformed for statistical testing. A two-way repeated-measures ANOVA was applied. Because a significant group \times time interaction was found for the main variables (ferritin, transferrin and Hb, $P \leq 0.001$), the repeated-measures ANOVA and the Bonferroni *post hoc* test were used to study the time effect within groups. Comparisons were also made between the F group and the P group using ANOVA. A *P* value of <0.05 was considered significant. Data were analysed using the SPSS statistical package for Windows (version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

A total of 122 volunteers completed the study (Fig. 1). Ages of the volunteers were 24.5 (SD 5.1) and 24.2 (SD 4.6) years for the P and F groups, respectively. Energy and nutrient intakes at baseline and week 16 are shown in Table 1.

No significant differences between groups were found in the baseline characteristics of subjects (Tables 2 and 3). Compliance rate was confirmed to be very high (approximately 100%).

Table 1. Energy and macronutrient intakes of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks (Mean values and standard deviations)

Groups	Baseline		Week 16		Time effect (<i>P</i>)†
	Mean	SD	Mean	SD	
Energy (kJ)					
Placebo	9452	2179	9826	2493	NS
Fortified	8807	2108	9285	2292	NS
Protein (% energy)					
Placebo	15.2	3.9	13.0	2.4	<0.001
Fortified	14.6	2.4	13.6	2.3	0.004
Carbohydrate (% energy)					
Placebo	41.2	7.3	45.0	7.3	0.001
Fortified	41.2	6.2	44.6	6.6	<0.001
Lipid (% energy)					
Placebo	39.9	7.8	37.3	6.3	NS
Fortified	39.7	6.5	36.4	6.8	0.001
Fe (mg)					
Placebo	15.1	4.7	12.9	4.7	0.001
Fortified	13.7*	5.9	30.4***	7.5	<0.001
Vitamin C (mg)					
Placebo	145.9	60.1	199.8	64.9	<0.001
Fortified	118.3	59.3	190.2	66.0	<0.001

Mean values were significantly different from the placebo group at each point (measured using one-sided tests): * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

† Time-point differences were analysed by repeated-measures ANOVA.

Although energy intake did not show significant differences between baseline and week 16 in both groups, an increase between week 4 and baseline was observed to be significant in the F group (9767 *v.* 8807 kJ/d for week 4 and baseline, respectively, $P < 0.05$). A significant decrease in the energy percentage from proteins and an increase in that from carbohydrates were observed during the study in both groups, and a decrease in the energy percentage from lipids was observed only in the F group. The differences between the groups were not significant (Table 1).

At baseline, Fe intake was slightly lower in the F group compared with the P group, and due to the Fe-fortified juice consumption, it was about twice that of the P group for the duration of the intervention. In contrast, Fe intake of the P group decreased with time, and it was significantly lower at week 16 compared with baseline. Vitamin C intake increased

Table 2. Anthropometric values of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks (Mean values and standard deviations)

Groups	Baseline		Week 16		Time effect (<i>P</i>)*
	Mean	SD	Mean	SD	
Weight (kg)					
Placebo	57.5	6.4	58.5	6.6	<0.0001
Fortified	59.6	7.6	60.5	7.8	<0.0001
BMI (kg/m^2)					
Placebo	21.6	2.2	22.0	2.2	<0.0001
Fortified	21.8	2.3	22.1	2.4	<0.0001
Waist circumference (cm)					
Placebo	68.7	4.7	68.8	4.6	NS
Fortified	69.6	5.4	69.8	5.4	NS

Mean values were not significant between the placebo and fortified groups at each point.

* Time-point differences were analysed by repeated-measures ANOVA.

Table 3. Haematological and biochemical markers of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks (Mean values and standard deviations)

Groups	Baseline		Week 4		Week 8		Week 12		Week 16		Time effect (<i>P</i>)†
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Total erythrocytes (×10 ⁻¹² /l)											
Placebo	4.50	0.35	4.49	0.33	4.48	0.29	4.51	0.34	4.45	0.30	NS
Fortified	4.51 ^{a,b}	0.30	4.49 ^a	0.32	4.53 ^{a,b}	0.32	4.56 ^b	0.31	4.53 ^{a,b}	0.30	0.046
Haematocrit (%)											
Placebo	39.3	2.9	39.2	2.8	38.9	2.5	38.9	2.6	38.7	2.6	NS
Fortified	39.0 ^a	2.8	39.4 ^a	2.5	39.4 ^a	2.7	40.1 ^{b**}	2.6	39.9 ^{a,b**}	2.4	0.006
Mean corpuscular volume (fl)											
Placebo	87.4 ^a	4.8	87.3 ^a	4.3	87.0 ^{a,b}	4.3	86.5 ^b	4.1	87.0 ^{a,b}	4.2	0.011
Fortified	86.6 ^a	5.1	87.9 ^{b,c}	3.9	87.1 ^{a,b}	4.2	88.1 ^{c*}	3.6	88.1 ^c	4.0	0.001
Red blood cell distribution width (%)											
Placebo	12.7 ^a	0.8	12.8 ^a	0.9	12.9 ^a	0.9	12.9 ^a	0.9	12.8 ^a	0.8	NS
Fortified	13.0 ^a	1.2	13.7 ^{b**}	2.3	13.5 ^{b*}	1.9	13.0 ^a	1.2	12.7 ^a	0.7	0.003
Hb (g/l)											
Placebo	133	9	133	9	132	8	132	8	132	8	NS
Fortified	132 ^a	9	133 ^a	8	135 ^b	9	136 ^{b*}	9	136 ^{b**}	8	<0.0001
Zinc protoporphyrin (μmol/mol haem)											
Placebo	—	—	79.3 ^{a,b}	26.9	79.9 ^{a,b}	29.4	76.1 ^a	32.5	86.1 ^b	33.7	0.049
Fortified	—	—	76.5 ^a	28.6	69.7 ^{b,c*}	26.1	67.1 ^b	24.1	74.6 ^{a,c*}	19.3	<0.0001
Serum Fe (mmol/l)											
Placebo	14.0	7.1	16.4	10.0	14.4	7.8	15.0	6.9	14.2	6.5	NS
Fortified	15.5	6.5	14.7	7.2	15.2	6.7	15.5	5.8	16.0	8.3	NS
Serum ferritin (ng/ml)											
Placebo	26.9	17.9	25.0	17.4	24.8	17.7	23.1	16.2	22.8	14.9	NS
Fortified	25.4 ^a	16.5	30.7 ^{b*}	13.6	34.1 ^{b,c**}	14.8	37.3 ^{c,d***}	16.5	40.7 ^{d***}	17.7	<0.0001
Serum transferrin (mg/l)											
Placebo	3213 ^a	676	3114 ^b	628	3208 ^{a,b}	618	3104 ^{a,b}	638	3232 ^{a,b}	718	0.001
Fortified	3102 ^a	519	2799 ^{b**}	449	2875 ^{b,c***}	486	2806 ^{b**}	438	2929 ^{c**}	509	<0.0001
Transferrin saturation (%)											
Placebo	19.2	7.9	19.6	10.3	17.8	9.7	19.1	9.0	17.8	11.7	NS
Fortified	19.7	10.7	23.7	15.3	22.2 [*]	10.8	23.4 [*]	9.9	23.0 [*]	11.3	NS
Soluble transferrin receptor (mg/l)											
Placebo	1.41	0.37	—	—	1.40	0.35	—	—	1.45	0.53	NS
Fortified	1.48 ^a	0.60	—	—	1.33 ^b	0.46	—	—	1.28 ^{b*}	0.43	0.001

Mean values were significantly different from the placebo group at each time-point (measured using one-sided tests): * $P < 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

† Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni test).

in both groups from baseline, due to juice composition, without significant differences between the P and F groups (Table 1).

The intervention induced increases in body weight and BMI, within normal limits (Table 2). Waist circumference did not change during the intervention. Physical activity was unchanged during the study and did not show differences between the groups; it was classified between very light and light (activity factor, 1.68 *v.* 1.68 in the P and F groups).

Table 3 shows the results of haematological and biochemical markers. Increases in the values of total erythrocytes, haematocrit, mean corpuscular volume, RDW, Hb, serum Fe, serum ferritin and transferrin saturation show recovery from Fe deficiency, while increases in serum transferrin, sTfR and ZnPP denote deterioration, as detailed below.

Total erythrocytes did not show significant differences between the groups. However, the F group showed significantly higher values at week 12 compared with week 4. Similarly, haematocrit values were significantly higher at week 12 compared with week 4 in this group, and higher haematocrit levels were shown at weeks 12 and 16 in the F group than in the P group ($P = 0.01$). Mean corpuscular volume decreased slightly at week 12 in the P group, while it

tended to increase in the F group; thus, differences between the groups were significant at week 12 ($P = 0.03$). RDW was higher in the F group than in the P group at weeks 4 and 8 ($P < 0.01$ and 0.05 , respectively).

Hb concentrations did not vary in the P group during the assay (Table 3), but they increased in the F group and were significantly higher at week 8 compared with baseline, and at weeks 12 and 16 compared with the P group ($P < 0.05$). ZnPP increased in the P group and decreased in the F group during the assay, and the differences between the groups were significant at weeks 8 and 16 ($P < 0.05$).

No changes in serum Fe concentrations were observed due to either group or time (Table 3). Ferritin concentrations, the principal variable of the present study, significantly increased from week 4 in the F group, and the values became about 80% higher compared with the P group at the end of the assay. In contrast, no changes were observed in the P group. Serum transferrin fluctuated above 3000 mg/l in the P group, while in the F group, it markedly decreased from week 4 to the end of the assay, and the differences between the groups were significant ($P < 0.01$). Accordingly, transferrin saturation was significantly higher from week 8 in the F group with respect to the P group ($P < 0.05$).

sTfR concentrations significantly decreased in the F group compared with baseline and the P group (significantly at week 16).

Discussion

The present study clearly shows that it is feasible to increase Fe status in an at-risk population by daily consumption of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice and that the effects are detected in a short period of time (4 weeks). This consumption was compatible with the usual diet, and the extra daily 18 mg of Fe provided in each 500 ml juice carton was 100% of the RDA^(3,4). This quantity of Fe is within the range of supplemental minerals added in European commercial foods (20% of the RDA/100 ml).

The study fruit juice was fortified with micronised encapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin. This form of Fe is dispersible in aqueous solution and has been demonstrated to be highly bioavailable. Its bioavailability is superior to that of non-micronised iron pyrophosphate, which has higher particle size, and to that of non-encapsulated iron pyrophosphate^(9–11,29). Roe *et al.*⁽³⁰⁾ enriched micronised iron pyrophosphate and ferrous sulphate with different Fe stable isotopes, and included each Fe form in apple juices to conduct an absorption experiment using the technique of the incorporation of Fe isotopes to erythrocytes. They concluded that the bioavailability of micronised iron pyrophosphate was higher relative to ferrous sulphate, indicating that it could be a useful fortifier for liquid food products.

Several studies using fortified food that supplied amounts of Fe similar to the present study have been reported, generally showing lower efficacy. The consumption of a wheat biscuit enriched with 10 mg of Fe (as encapsulated sulphate) during 22 weeks increased iron ferritin but not Hb levels in young women⁽³¹⁾. A recent study in female soldiers who received 56 mg of Fe/d in the form of food bars compared with placebo during 9 weeks has shown no changes in serum ferritin, transferrin saturation, %RDW and sTfR⁽³²⁾. The difference between these two studies and ours could be explained by the presence of phytates and the absence of AA in their Fe-fortified products, while the fruit juices of the present study contained no phytate and were fortified with AA. When AA is present, as in one study giving 16 mg of Fe-fortified breakfast cereal with kiwifruit, increases in ferritin and Hb were observed⁽³³⁾, in agreement with the present study.

In the present study, the food matrix used was an acidic drink that contained AA with a molar AA:Fe ratio of 1.7:1. Several reports have discussed the importance of this ratio; however, there is no agreement on the optimal ratio to facilitate Fe absorption. A linear relationship between molar AA:Fe ratio and Fe absorption has been suggested⁽³⁴⁾, but Cook & Reddy⁽¹⁵⁾ did not observe differences in Fe absorption between diets with AA:Fe ratios of 1.2:1, 2.4:1 and 4.5:1. This was attributed to the fact that Fe absorption was measured from a complete diet and not from individual meals. However, their study was criticised by Hunt⁽³⁵⁾ because subjects were instructed to select or avoid foods according to their AA content, which resulted in highly variable estimates of

reported AA intakes. Shah *et al.*⁽³⁶⁾ compared Fe absorption in children consuming meals that were accompanied by either apple or orange juice, to which 5 mg of aqueous ferrous sulphate enriched with a stable isotope was added. They found that Fe absorption was similar to the orange and apple juices, even though the orange juice had much higher vitamin C content.

The effect of the AA:Fe ratio on Fe bioavailability depends on inhibitors present in the food⁽³⁴⁾, and several authors have suggested a ratio of 2:1 for low-phytate content foods^(34,37), which is equivalent to the ratio of the juices assayed in the present study.

It is also important to consider that volunteers in the present study drank the 500 ml of juice separately at least 2 h after their meals; thus, the provided Fe could not interact with inhibitors present in the diet. Moreover, the low Fe status of these women at the beginning of the assay constituted a factor to favour Fe absorption⁽¹³⁾. Therefore, the Fe supplement given in the form of fruit juices was highly bioavailable and was efficacious to improve Fe status in Fe-deficient young women.

The short-term response observed in the present study was unexpected, and the effect was clearly shown in the principal variable, ferritin, a marker of Fe stores. To our knowledge, this is the first study to demonstrate a significant increase in this parameter after the consumption of an Fe-fortified functional beverage during 1 month. Therefore, it was found that in a very short period of time, and using a relatively low additional intake of Fe, the biomarkers of Fe status improved in non-anaemic Fe-deficient women.

Moreover, it was observed that markers such as Hb or haematocrit, which were within normal ranges, increased after 3 months. The observed increase in RDW in the enriched group could also indicate a recovery from Fe deficiency. The RDW levels of the F group became higher in the first months, indicating greater variation in width, and returned to baseline levels at the end of the assay, which corresponds to the average lifespan of erythrocytes⁽³⁸⁾. These results are consistent with the observed increase in mean corpuscular volume and haematocrit after the consumption of the Fe-enriched fruit juice.

Other indices, sTfR and ZnPP, which are not widely available as standardised clinical determinations, also indicate an improvement of Fe status. Both reflect marrow Fe status for erythropoiesis and recovery from Fe deficiency⁽³⁹⁾.

The present study was performed in a European population at risk of Fe-deficiency anaemia (i.e. young menstruating women with low Fe stores), and it is important to indicate that intake of the juice portions was compatible with the usual diet, and that the amount of Fe ingested daily via the enriched juice was one-fifth of the usual therapeutic dose (100 mg) of Fe. Under these experimental conditions, ferritin levels increased by 80%. It should be pointed out that once the assay started, none of the volunteers receiving the Fe-fortified juice dropped out and that they did not complain about digestive discomfort. Therefore, these results are outstanding and suggest that Fe-fortified juices could be used as part of the dietary treatment of anaemic patients in order to correct anaemia more effectively.

The slight increments of energy intake and body weight indicate high compliance, as all juices contained 10 g/100 ml of carbohydrates (non-added sugars). However, mean body-weight gain was only 1 kg, and BMI remained within normal limits during the whole intervention. This is a controversial issue because high consumption of fruit juices should be limited in order to prevent obesity, especially in children and young people. However, the present results show that the percentage of energy from protein and fat is reduced by the inclusion of the daily juices in the diet, and the energy profile tended to be more balanced. In this respect, dietary guidelines recommend 45–60% of energy from carbohydrates, and concerning sugar intake, even added sugar, the European Food Safety Authority has recently indicated that there were insufficient data to set an upper limit⁽⁴⁰⁾. Moreover, Western populations show a low consumption of fruits and vegetables^(41,42), and the beneficial effects of these fruit juices on other aspects of health should be explored. Nevertheless, sugar content could be reduced in future products that might be used as alternatives in subjects predisposed to anaemia and also obesity or diabetes.

A physiological adaptation appears to occur, since the increase in body weight was observed at the beginning of the assay (data not shown); thus, it is possible that energy from foods other than the juice decreased to compensate for the energy provided by the juices. It should be pointed out that none of the Fe-deficient women participating in this intervention were obese, and that their physical activity was unchanged during the study.

Fe-fortified juice consumption should be recommended to individuals with predisposition to Fe-deficiency anaemia but not to those at risk of excessive Fe intake who do not need to increase their Fe supply, such as patients with Fe overload⁽⁴³⁾. Therefore, consumption of an Fe-fortified fruit juice may be considered as a supplement to prevent Fe-deficient anaemia in population risk groups, such as women of child-bearing age, pregnant women or children. These groups have a high acceptance of fruit juices, and the concept of functional foods also has high acceptance in developed countries. The present study can have repercussions on public health as prevention of one of the most widespread diseases will have important economic impact, decreasing the need to use public health services and pharmaceutical Fe supplements. The cost benefits of the consumption of this Fe-fortified food compared with those of the pharmaceutical therapy and health care services should be studied. In fact, in the present study, consumption of the Fe-fortified juice led to a recovery from depleted Fe stores (ferritin <12 ng/ml), with only one woman remaining depleted.

Further studies should be focused on the effectiveness of this Fe-fortified beverage in subjects according to their genetic background, in the line of previous studies^(43,44). Consumer aspects such as the optimal amount of fruit juice to be drunk, according to concentration of the Fe salt to be included, cost, palatable aspects and acceptability should also be investigated. Finally, the effect of such Fe-enriched juices on subjects with Fe-deficiency anaemia, obesity,

diabetes or CVD and their corresponding nutrigenomic aspects should also be studied.

Acknowledgements

The present study was supported by Grupo Leche Pascual and Projects reference AGL2006 09519/ALI and reference AGL2009 11437. R. B.-R. was supported by a JAE-predoc grant from European Social Fund and CSIC, Spain, and L. T. was supported by a predoctorate grant from CONACyT, Mexico. The authors are grateful to I. Wright for revising the English text and to the volunteers who participated in the study. The authors' responsibilities were as follows: R. B.-R., A. M. P.-G. and L. T. contributed to the study design, data collection, analysis and manuscript preparation; R. B.-R. and A. M. P.-G. implemented the recruitment and follow-up of study participants; C. G.-V. contributed to the analytical determinations; M. A. D. manufactured the beverages; and M. P. V. was the principal investigator of the study, contributed to the study design and manuscript preparation. M. A. D. works for Grupo Leche Pascual. R. B.-R., A. M. P.-G., L. T., C. G.-V. and M. P. V. had no conflict of interest.

References

1. World Health Organization (2008) Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. In *WHO Global Database on Anaemia* [EM de Benoist, I Egli and M Cogswell, editors]. Geneva: World Health Organization.
2. Lynch SR (2005) The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **18**, 333–346.
3. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, *et al.* (2009) Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española (Recommended intakes of energy and nutrients for the Spanish population). In *Tablas de composición de alimentos (Food Composition Tables)*, 13th ed., pp. 227–230. Madrid: Pirámide, Grupo Anaya, SA.
4. Institute of Medicine and Food and Nutrition Board (2001) *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, DC: National Academic Press.
5. Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Schoppen S, *et al.* (2009) Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem* **65**, 165–174.
6. Hurrell RF (2002) Fortification: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr* **132**, 806S–812S.
7. WHO/FAO (2004) *Guidelines on Food Fortification with Micronutrients* [L Allen, B de Benoist, O Dary and Richard Hurrell, editors]. Geneva: World Health Organization.
8. Navas-Carretero S, Sarria B, Pérez-Granados AM, *et al.* (2007) A comparative study of iron bioavailability from cocoa supplemented with ferric pyrophosphate or ferrous fumarate in rats. *Ann Nutr Metab* **51**, 204–207.
9. Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Sarriá B, *et al.* (2007) Iron bioavailability from pate enriched with encapsulated ferric pyrophosphate or ferrous gluconate in rats. *Food Sci Tech Int* **13**, 159–163.
10. Fidler MC, Walczyk T, Davidsson L, *et al.* (2004) A micronised, dispersible ferric pyrophosphate with high relative bioavailability in man. *Br J Nutr* **91**, 107–112.

11. Moretti D, Zimmermann MB, Wegmuller R, *et al.* (2006) Iron status and food matrix strongly affect the relative bioavailability of ferric pyrophosphate in humans. *Am J Clin Nutr* **83**, 632–638.
12. Reddy MB, Hurrell RF & Cook JD (2000) Estimation of non-heme-iron bioavailability from meal composition. *Am J Clin Nutr* **71**, 937–943.
13. Hurrell R & Egli I (2010) Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr* **91**, 1461S–1467S.
14. Conrad ME & Schade SG (1968) Ascorbic acid chelates in iron absorption: a role for hydrochloric acid and bile. *Gastroenterology* **55**, 35–45.
15. Cook JD & Reddy MB (2001) Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr* **73**, 93–98.
16. Nogueira de Almeida C, Crott G, Ricco R, *et al.* (2002) Control of iron-deficiency anaemia in Brazilian preschool children using iron-fortified orange juice. *Nutr Res* **23**, 27–33.
17. Ash DM, Tatala SR, Frongillo EA Jr, *et al.* (2003) Randomized efficacy trial of a micronutrient-fortified beverage in primary school children in Tanzania. *Am J Clin Nutr* **77**, 891–898.
18. Abrams SA, Mushi A, Hilmers DC, *et al.* (2003) A multivitamin-fortified beverage enhances the nutritional status of children in Botswana. *J Nutr* **133**, 1834–1840.
19. Makola D, Ash DM, Tatala SR, *et al.* (2003) A micronutrient-fortified beverage prevents iron deficiency, reduces anemia and improves the hemoglobin concentration of pregnant Tanzanian women. *J Nutr* **133**, 1339–1346.
20. Solon FS, Sarol JN Jr, Bernardo AB, *et al.* (2003) Effect of a multiple-micronutrient-fortified fruit powder beverage on the nutrition status, physical fitness, and cognitive performance of schoolchildren in the Philippines. *Food Nutr Bull* **24**, S129–S140.
21. Hyder SM, Haseen F, Khan M, *et al.* (2007) A multiple-micronutrient-fortified beverage affects hemoglobin, iron, and vitamin A status and growth in adolescent girls in rural Bangladesh. *J Nutr* **137**, 2147–2153.
22. Moher D, Schulz KF & Altman DG (2001) The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. *Ann Intern Med* **134**, 657–662.
23. Koulaouzidis A, Cottier R, Bhat S, *et al.* (2009) A ferritin level > 50 microg/L is frequently consistent with iron deficiency. *Eur J Intern Med* **20**, 168–170.
24. de Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, *et al.* (1996) Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA Study. *Eur J Clin Nutr* **50**, Suppl. 2, S123–S124.
25. Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Schoppen S, *et al.* (2009) An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young iron-deficient women. *Br J Nutr* **102**, 546–553.
26. Dietas y cálculos de alimentación (DIAL) (Diets and food calculations), Alce Ingeniería, Spain. <http://www.alceingenieria.net/nutricion.htm> (accessed December 2009).
27. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (2007) Anthropometry procedures manual. <http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/> (accessed September 2008).
28. National Research Council (1989) *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed. Washington, DC: National Academic Press.
29. Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Sarria B, *et al.* (2009) Iron absorption from meat pate fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. *Nutrition* **25**, 20–24.
30. Roe MA, Collings R, Hoogewerff J, *et al.* (2009) Relative bioavailability of micronized, dispersible ferric pyrophosphate added to an apple juice drink. *Eur J Nutr* **48**, 115–119.
31. Zimmermann MB, Winichagoon P, Gowachirapant S, *et al.* (2005) Comparison of the efficacy of wheat-based snacks fortified with ferrous sulfate, electrolytic iron, or hydrogen-reduced elemental iron: randomized, double-blind, controlled trial in Thai women. *Am J Clin Nutr* **82**, 1276–1282.
32. Karl JP, Lieberman HR, Cable SJ, *et al.* (2010) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of an iron-fortified food product in female soldiers during military training: relations between iron status, serum hepcidin, and inflammation. *Am J Clin Nutr* **92**, 93–100.
33. Beck K, Conlon CA, Kruger R, *et al.* (2011) Gold kiwifruit consumed with an iron-fortified breakfast cereal meal improves iron status in women with low iron stores: a 16-week randomised controlled trial. *Br J Nutr* **105**, 101–109.
34. Lynch SR & Stoltzfus RJ (2003) Iron and ascorbic acid: proposed fortification levels and recommended iron compounds. *J Nutr* **133**, 2978S–2984S.
35. Hunt JR (2001) How important is dietary iron bioavailability? *Am J Clin Nutr* **73**, 3–4.
36. Shah M, Griffin IJ, Lifschitz CH, *et al.* (2003) Effect of orange and apple juices on iron absorption in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* **157**, 1232–1236.
37. Hurrell RF, Lynch S, Bothwell T, *et al.* (2004) Enhancing the absorption of fortification iron. A SUSTAIN Task Force report. *Int J Vitam Nutr Res* **74**, 387–401.
38. Dugdale AE (2006) Predicting iron and folate deficiency anaemias from standard blood testing: the mechanism and implications for clinical medicine and public health in developing countries. *Theor Biol Med Model* **3**, 34.
39. Labbe RF & Dewanji A (2004) Iron assessment tests: transferrin receptor *vis-à-vis* zinc protoporphyrin. *Clin Biochem* **37**, 165–174.
40. European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2010) Scientific opinion on dietary reference values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA J* **8**, 1462 (epublication 25 March 2010).
41. Casagrande SS, Wang Y, Anderson C, *et al.* (2007) Have Americans increased their fruit and vegetable intake? The trends between 1988 and 2002. *Am J Prev Med* **32**, 257–263.
42. Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, *et al.* (2010) American Heart Association Strategic Planning Task Force and Statistics Committee. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation* **121**, 586–613.
43. Toxqui L, De Piero A, Courtois V, *et al.* (2010) Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutr Hosp* **25**, 350–365.
44. Sarria B, López-Parra AM, Navas-Carretero S, *et al.* (2007) Hepcidin, transferrin (exon 7) and hemochromatosis genotyping suggests that haplotype block analysis is the best strategy for predicting iron deficiency phenotype in women. *Nutr Res* **27**, 672–678.

5. RELACIÓN ENTRE LA VITAMINA D, EL REMODELADO ÓSEO Y EL ESTADO DE HIERRO EN MUJERES JÓVENES CON DEFICIENCIA DE HIERRO QUE CONSUMEN UN ALIMENTO FORTIFICADO CON HIERRO.

European Journal of Nutrition (2012), en prensa. DOI: 10.1007/s00394-012-0375-8

Antecedentes: Las deficiencias de hierro y de vitamina D son dos de los desórdenes nutricionales más frecuentes a nivel mundial. Por ello, nuestro objetivo fue conocer si el consumo de un zumo de frutas fortificado con hierro modificaba el remodelado óseo y si el estatus inicial de vitamina D ejercía alguna influencia en la recuperación del estado de hierro de un grupo de mujeres jóvenes con deficiencia de hierro.

Métodos: Se determinaron los parámetros del estado del hierro y los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D, así como la ingesta dietética de 123 mujeres menstruantes con deficiencia de hierro. Un subgrupo de estas mujeres (n=41) participó en un estudio aleatorizado, doble ciego controlado por placebo de 16 semanas de duración durante el invierno. Las mujeres consumieron un zumo placebo (P) o fortificado con hierro (F). La ingesta dietética, los niveles de 25-hidroxivitamina D, paratohormona (PTH), isoenzima óseo de la fosfatasa alcalina (ALP), telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX) y los biomarcadores del estado de hierro fueron determinados.

Resultados: El 92% de las mujeres con deficiencia de hierro mostraron niveles de vitamina D deficientes o insuficientes. La saturación de la transferrina y la 25-hidroxivitamina D se correlacionaron de forma positiva. El estado de hierro mejoró en el grupo F y disminuyeron los niveles de 25-hidroxivitamina D en ambos grupos. Los valores de PTH, ALP y NTX se mantuvieron en rangos normales y no mostraron variación. Las mujeres que presentaban niveles de 25-hidroxivitamina D ≥ 50 nmol/L frente a las que presentaban valores ≤ 50 nmol/L mostraron un mayor incremento de la saturación de la transferrina, indicadora del suministro de hierro a tejidos, durante la recuperación de los niveles de hierro.

Conclusión: La prevalencia de la deficiencia o insuficiencia de vitamina D es muy elevada en estas mujeres con deficiencia de hierro. La recuperación del estado de hierro por el consumo del alimento fortificado no afecta los niveles de 25-hidroxivitamina D, sin embargo el aumento del suministro de hierro a los tejidos es inferior si las mujeres presentan también deficiencia de vitamina D. Aunque la salud ósea no parece estar afectada en este grupo de mujeres, la corrección de ambas deficiencias en mujeres jóvenes debe ser fomentada para lograr la mejora de la salud, tanto a corto como a largo plazo.

Palabras clave: anemia por deficiencia de hierro, 25-hidroxivitamina D, remodelado óseo, alimento fortificado, mujeres menstruantes.

Relationship between vitamin D deficiency, bone remodelling and iron status in iron-deficient young women consuming an iron-fortified food

Ruth Blanco-Rojo · Ana M. Pérez-Granados ·
Laura Toxqui · Pilar Zazo · Concepción de la Piedra ·
M. Pilar Vaquero

Received: 25 January 2012 / Accepted: 2 May 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract

Background Iron and vitamin D deficiencies are two of the most widespread nutritional disorders in the world. Our aim was to know whether the consumption of an iron-fortified fruit juice modifies bone remodelling and the possible influence of baseline vitamin D status on the recovery of iron status in a group of iron-deficient women. **Methods** Iron biomarkers, 25-hydroxyvitamin D levels and dietary intake were measured in 123 iron-deficient menstruating women. A subgroup ($n = 41$) participated in a randomised double-blind placebo-controlled study of 16-weeks during winter. They consumed a placebo fruit juice (P) or iron-fortified fruit juice (F). Dietary intake, 25-hydroxyvitamin D, parathormone (PTH), bone alkaline phosphatase (ALP), aminoterminal telopeptide of collagen I (NTX) and iron biomarkers were determined.

Results Ninety-two per cent of the iron-deficient women were vitamin D deficient or insufficient. Transferrin saturation and 25-hydroxyvitamin D were positively correlated. Iron status improved in F, 25-hydroxyvitamin D decreased in F and P, and PTH, ALP and NTX levels were within the normal range and did not vary. Women with 25-hydroxyvitamin D ≥ 50 nmol/L compared with 25-hydroxyvitamin D < 50 nmol/L showed a higher increase in

transferrin saturation (a marker of iron supply to tissues) during iron recovery.

Conclusion The prevalence of vitamin D deficiency or insufficiency is very high in iron-deficient women. The recovery of iron status by consuming an iron-fortified food does not affect 25-hydroxyvitamin D levels; however, the increase in iron supply to tissues is lower if the women also present vitamin D deficiency. Although bone health does not seem to be affected in this group of women, correction of iron and vitamin D deficiencies should be promoted in young women to improve present and future health.

Keywords Iron deficiency anaemia · 25-hydroxyvitamin D · Bone remodelling · Fortified food · Menstruating women

Introduction

Iron deficiency anaemia and vitamin D deficiency are extremely common and widespread nutritional disorders in the world [1, 2]. Some studies have been suggested a relationship between iron deficiency and low 25-hydroxyvitamin D levels [3–5]. Nevertheless, there are no reports regarding the effect that the combined presence of these two deficiencies could have on bone metabolism.

The relationship between these two deficiencies is not clear, but seems to be reciprocal. On the one hand, clinical observations suggest a role of 1,25-dihydroxyvitamin D [6] in erythropoiesis, as this hormone directly stimulates erythroid precursors [7]. On the other hand, iron participates in the second activation step of vitamin D, necessary to make this hormone functional. This conversion is done by a renal 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase (1 α -OHase) enzyme that comprises a cytochrome P-450, a ferredoxin and a

R. Blanco-Rojo · A. M. Pérez-Granados · L. Toxqui ·
M. P. Vaquero (✉)
Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food
Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish
National Research Council (CSIC), C/José Antonio Novais 10,
28040 Madrid, Spain
e-mail: mpvaquero@ictan.csic.es

P. Zazo · C. de la Piedra
Department of Biochemistry Investigation, Fundación Jiménez
Díaz Institute for Medical Research (IIS-FJD), Madrid, Spain

ferredoxin reductase [8]. Therefore, less available iron could compromise production of the active form of vitamin D.

With respect to the effect that these deficiencies could have on bone metabolism, the role of vitamin D in mineralising the skeleton by increasing serum calcium concentrations is well known [9]. Vitamin D deficiency is associated with rickets in children and osteomalacia in adults and a higher risk of osteoporosis [1]. Iron is essential in collagen synthesis since it is a required cofactor for the prolyl and lysyl hydroxylases. These enzymes act on the nascent peptide chain prior to triple helix formation, and the reaction products serve to stabilise the collagen triple helices under physiological conditions [10]. It is hypothesised that in an iron deficiency situation, there may be less iron available to the prolyl and lysyl hydroxylases which could result in decreased cross-linking activity and, subsequently, weaker collagen fibres. In fact, severe iron deficiency anaemia has been associated with deleterious effects on bone in rats. Previous studies showed that iron-deficient anaemic rats had lower bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD) and mechanical strength than iron-replete animals [11–13].

In humans, few studies are available, and the results are less consistent. A trend for positive association between bone mineral density of the radius and serum ferritin was found in adolescent girls [14]. One study carried out in postmenopausal women showed that osteoporotic women with fractures presented a relative iron deficiency compared with controls [15]. Therefore, women who suffer from iron deficiency during decades may develop osteoporosis later in life. However, there is no information on bone metabolism in iron-deficient menstruating women and the possible changes in bone turnover during iron status recovery.

Consumption of iron-supplemented foods can be useful to prevent iron deficiency anaemia. In this sense, iron-enriched fruit juices have recently been found to be very efficacious at improving iron status in young iron-deficient women [16] which was attributed to the amount of iron in the juice, the presence of iron absorption enhancers, such as ascorbic acid, and absence of inhibitors.

The present study was carried out in iron-deficient menstruating women in order to know: (1) if there is a relationship between 25-hydroxyvitamin D levels and iron status biomarkers; (2) if consumption of an iron-fortified fruit juice that improves iron status modifies bone remodelling; and (3) if the recovery of iron status by consuming this iron-fortified food varies depending on baseline vitamin D status.

This trial was registered at clinicaltrials.gov as NCT01135576.

Subjects and methods

Subjects

A group of 123 women was recruited during winter season. The inclusion criteria were as follows: women aged 18–35 years, non-smoker, non-pregnant, non-breastfeeding, with low iron stores, defined as serum ferritin < 40 ng/mL and haemoglobin \geq 11 g/dL. Subjects were excluded from the study if they had amenorrhoea, menopause or any known health problems likely to influence iron status including iron-metabolism-related diseases (iron deficiency anaemia, thalassaemia, haemochromatosis), chronic gastric diseases (inflammatory bowel disease, Crohn disease, gastric ulcers, coeliac disease, haemorrhagic diseases), renal disease or allergy to any of the components of the assay juices. Other exclusion criteria were as follows: blood donors or to have regularly consumed iron supplements within the 4 months prior to participating in the intervention.

The participants signed a written informed consent to a protocol approved by the Clinical Research Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, and the Spanish National Research Council Committee, Madrid, Spain.

Nutritional intervention

A subgroup of the aforementioned volunteers selected at random ($n = 41$) participated in a randomised double-blind placebo-controlled study of 16 weeks of duration, from November to March. Two groups: P group ($n = 18$) or F group ($n = 23$) consumed 500 mL/day of placebo fruit juice or iron-fortified fruit juice, respectively. The fortified juice supplied 18 mg of iron per 500 mL carton, in the form of microencapsulated iron pyrophosphate coated with lecithin, equivalent to 100 % of the recommended dietary allowance (RDA) per day [17], and all juices were fortified with vitamin C. Details of the nutritional composition of the juices and conditions of the study were reported previously [16]. At baseline, 8- and 16-week blood samples and 24-h urine samples were collected and stored at -80°C for analytical determination.

Each subject's dietary intake was evaluated at baseline and every 8 weeks to control any possible changes in energy and nutrient intake. They completed a 72-h detailed dietary intake report, previously validated and proved valuable to assess nutrient intake [18, 19], specifying the types of food consumed and serving weights. Daily food, energy intake, nutrient intake and energy provided by macronutrients were calculated with a computer application using the Spanish Food Composition Database [20].

Blood sampling and biochemical assays

Blood samples were collected by venipuncture after a 12-h fasting period, between 0800 hours and 0900 hours. Serum and plasma were obtained after centrifugation at 1,000 g for 15 min and stored at -80°C .

Total red blood cells, haematocrit, mean corpuscular volume (MCV) and haemoglobin were determined following standard laboratory techniques using the Symex NE 9100 automated haematology analyser (Symex, Kobe, Japan). Serum iron, serum ferritin and serum transferrin were determined by the Modular Analytics Serum Work Area analyser (Roche, Basel, Switzerland). Transferrin saturation (%) was calculated as follows: serum iron ($\mu\text{mol/L}$)/TIBC ($\mu\text{mol/L}$) \times 100, where TIBC is total iron-binding capacity, calculated as $25.1 \times$ transferrin (g/L).

Serum 25-hydroxyvitamin D (25-hydroxyvitamin D₂ plus 25-hydroxyvitamin D₃) was determined using an ELISA technique (25-hydroxyvitamin D EIA, IDS, UK). The ELISA was performed in an automated microplates analyser (Personal Lab, Adaltis, Italy). Intra- and inter-assay coefficients of variation of the method were 5.6 and 6.4 %, respectively. Sensitivity of the method is 2 ng/mL. Deficient vitamin D status was defined as a circulating 25-hydroxyvitamin D concentration < 50 nmol/L (< 20 ng/mL), insufficient status was considered 51–74 nmol/L (21–29 ng/mL) and sufficient > 75 nmol/L (> 30 ng/mL) [1].

Also, biochemical markers of bone turnover and PTH were only determined during the nutritional intervention. As a marker of bone formation, serum isoenzyme of bone alkaline phosphatase (ALP) was quantified with an ELISA technique (Ostase[®]Bap, IDS, UK) using two monoclonal antibodies specific for bAP over liver AP. The ELISA was performed in an automated microplates analyser (Personal Lab, Adaltis, Italy). Sensitivity of the method is 7 $\mu\text{g/L}$. Intra- and inter-assay coefficients of variation are 4.5 and 6.1 %, respectively. Normal range: 3–15 $\mu\text{g/L}$. The biochemical marker of bone resorption, aminoterminal telopeptide of collagen I (NTX) was determined in 24-h urine pool by an ELISA test (Osteomark[®]NTx Urine, Wampole Laboratories, USA). The ELISA was performed in an automated microplates analyser (Personal Lab, Adaltis, Italy). Sensitivity of the method is 1 nM of bone collagen equivalents (BCE). Intra- and inter-assay coefficients of variation are 5 and 5.5 %, respectively. Normal range: 15–80 nM BCE/mM creatinine. PTH was determined by chemiluminescence assay of second generation PTH (Elecsys, Roche Diagnostics, USA). Intra- and inter-assay coefficients are 2.7 and 6.5 %, respectively, and normal range is 15–65 pg/mL. Normal ranges of ALP, NTX and PTH for healthy women (30–45 years old) were estimated at the Fundación Jiménez Díaz Institute for Medical Research (IIS-FJD), Madrid, Spain.

Statistical analysis

Data are presented as means with their standard deviations. A normal distribution of variables was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. Serum ferritin values were log transformed for statistical testing. Pearson's linear correlation tests between serum 25-hydroxyvitamin D levels and iron biomarkers at baseline were performed.

In the nutritional intervention data, repeated-measures ANOVA and post hoc Bonferroni test were used to study time effect within groups. Comparisons were also made between the F group and the P group using ANOVA. To know whether the recovery of iron status after consuming this iron-fortified food varies depended on baseline vitamin D status, a two-way repeated-measures ANOVA with 25-hydroxyvitamin D levels (< 50 nmol/L and ≥ 50 nmol/L) as the between-subjects factor was applied for each parameter in P and F group. Comparisons between volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels < 50 nmol/L and volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels ≥ 50 nmol/L at each point were measured using ANOVA. $p < 0.05$ was considered significant. The SPSS statistical package for Windows (version 19.0) was used to analyse the data.

Results

Table 1 shows the baseline characteristics of the subjects. No significant differences between the total group and the subgroup that participated in the nutritional intervention were found. In this group of iron-deficient women ($n = 123$), 42.3 % presented vitamin D deficiency, 49.6 % vitamin D insufficiency and 8.1 % vitamin D sufficient. There was a significant positive correlation between serum 25-hydroxyvitamin D and transferrin saturation ($p = 0.007$), but the correlations between serum 25-hydroxyvitamin D and haemoglobin, serum ferritin and serum transferrin were not significant.

Dietary characteristics of the total group are presented in Table 2. No significant associations between nutrient intake and 25-hydroxyvitamin D levels and iron parameters were found.

Table 3 shows energy and nutrient intakes at baseline and week 16 of iron-deficient women consuming placebo or iron-fortified fruit juices. Although energy intake did not show significant differences between baseline and week 16 in either groups, a decrease in the energy percentage from proteins ($p = 0.02$ in P group) and a trend towards increase in that from carbohydrates were observed during the study. At baseline, there was no difference in iron intake between both groups, but for the duration of the intervention, due to the consumption of the iron-fortified juice, iron intake was approximately double in F group compared with P group.

Table 1 Iron biomarkers and 25OH vitamin D of the total group and the subgroup of volunteers

	Total group (<i>n</i> = 123)	Subgroup (<i>n</i> = 41)
Age (years)	24.3 ± 4.8	25.5 ± 5.9
Body mass index (kg/m ²)	21.7 ± 2.2	21.8 ± 2.3
Haemoglobin (g/dL)	13.2 ± 0.9	13.2 ± 0.8
Serum ferritin (ng/mL)	26.4 ± 17.5	22.6 ± 12.2
Serum transferrin (mg/dL)	314.5 ± 60.5	318.6 ± 53.8
Transferrin saturation (%)	19.3 ± 9.2	17.1 ± 7.7
25-hydroxyvitamin D (nmol/L)	54.2 ± 18.0	50.2 ± 14.0
% Deficient vitamin D status (<50 nmol/L)	42.3	53.6
% Insufficient vitamin D status (51–74 nmol/L)	49.6	41.5
% Sufficient vitamin D status (>50 nmol/L)	8.1	4.9

Differences between groups were not significant. Data are mean ± SD

Table 2 Energy and macronutrient intakes of iron-deficient women

Energy (kJ/day)	9,091 ± 2,512
Protein (% energy/day)	14.6 ± 4.2
Carbohydrate (% energy/day)	41.8 ± 13.0
Lipids (% energy/day)	40.2 ± 13.4
Iron (mg/day)	14.1 ± 4.7
Calcium (mg/day)	977.5 ± 355.8
Magnesium (mg/day)	283.8 ± 87.9
Phosphorus (mg/day)	1,423 ± 363
Vitamin D (µg/day)	3.0 ± 2.4
Vitamin C (mg/day)	131.2 ± 60.8
Vitamin K (µg/day)	134.0 ± 89.6

Data are mean ± SD (*n* = 123)

Vitamin C intake increased in both groups from baseline, due to juice composition, without significant differences between P and F groups. There were no changes in the other nutrient intakes determined.

Table 4 shows the results of iron and bone biomarkers of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks. In F group, significant increases in haemoglobin, serum ferritin and transferrin saturation levels and decreases in serum transferrin levels, show recovery from iron deficiency ($p = 0.03$, $p < 0.001$, $p = 0.008$, $p < 0.001$, respectively), and compared with P group haemoglobin, serum ferritin levels were significantly higher at week 16 ($p < 0.01$ and $p < 0.05$). Serum 25-hydroxyvitamin D significantly decreased from baseline to the end of the study in P and F ($p < 0.001$), without differences between groups. No changes were observed in PTH, ALP and NTX in P or F group.

Transferrin saturation did not change during the experimental period in the P group. Figure 1 shows transferrin saturation increase in volunteers of F group depending on baseline 25-hydroxyvitamin D levels (time influence, $p = 0.008$, time × 25-hydroxyvitamin D level, NS). Transferrin saturation was significantly higher in the F subgroup with 25-hydroxyvitamin D levels ≥ 50 nmol/L compared with 25-hydroxyvitamin D levels < 50 nmol/L at 8 and 16 weeks ($p = 0.05$ and $p = 0.04$, respectively).

Discussion

Present results show for the first time a relationship between iron deficiency anaemia and vitamin D deficiency in menstruating Spanish women. A positive association between 25-hydroxyvitamin D and transferrin saturation was observed in these women. The best marker of vitamin D status is 25-hydroxyvitamin D, while transferrin saturation is the marker of the supply of iron to tissues. Recovery of transferrin saturation, due to the consumption of an iron-fortified fruit juice, was found to be lower if the iron-deficient women had also vitamin D deficiency.

It is remarkable that the majority (92 %) of the women who participated in the study were vitamin D deficient or insufficient, and this percentage is higher than data of hypovitaminosis D described for Spanish adolescent women (63 %) [21] and Spanish young adults (61 %) [22]. Therefore, this suggests that there is an association between the deficiencies of both micronutrients in our population.

There are many different factors that could independently influence the development of these two deficiencies in this population group, such as nutritional, genetic, physiological and environmental factors. Concerning dietary intake at baseline (Table 2), iron and vitamin D intakes were below the Recommended Dietary Allowance (RDA) for this population group (18 mg/day and 5 µg/day, respectively) [23, 24]. Regarding iron intake, the RDA is not easily reached by menstruating women, as previously reported by our research group [25, 26]. Although the influence of dietary components on iron absorption is well known [27], in the present study, no association between nutrient intake and iron biomarkers was found. However, the increase in iron intake due to the consumption of the iron-fortified fruit juice clearly improved iron status, showed by the increasing in haemoglobin, ferritin and transferrin saturation. The influence of this iron pyrophosphate-fortified fruit juice on other iron parameters was detailed in a recent article [16]. Few foods naturally contain vitamin D, so a deficient intake is generally observed in the general population [28]. In agreement with this, vitamin D intake in the present study only reached 60 % of the RDA. The lack of association between dietary vitamin

Table 3 Energy and nutrient intakes of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks

	Group	Baseline	Week 16	<i>p</i> time
Energy (kJ/day)	Placebo	9,087 ± 2,282	10,420 ± 2,846	NS
	Fortified	8,477 ± 1,816	9,571 ± 2,489	NS
Protein (% energy/day)	Placebo	14.9 ± 2.6	13.3 ± 1.8	0.02
	Fortified	14.1 ± 2.4	13.5 ± 2.3	NS
Carbohydrate (% energy/day)	Placebo	38.7 ± 7.7	42.7 ± 8.3	NS
	Fortified	42.5 ± 5.8	43.9 ± 6.6	NS
Lipids (% energy/day)	Placebo	42.5 ± 7.7	39.3 ± 7.0	NS
	Fortified	39.9 ± 6.05	39.0 ± 6.2	NS
Iron (mg/day)	Placebo	15.6 ± 5.5	14.0 ± 5.5	NS
	Fortified	13.1 ± 3.5	32.1 ± 9.1***	<0.001
Calcium (mg/day)	Placebo	1,044 ± 380	1,003 ± 412	NS
	Fortified	905 ± 262	834 ± 310	NS
Magnesium (mg/day)	Placebo	266.8 ± 109.6	275.1 ± 92.1	NS
	Fortified	267.2 ± 49.4	262.2 ± 95.3	NS
Phosphorus (mg/day)	Placebo	1,361.6 ± 348.9	1,472.0 ± 509.6	NS
	Fortified	1,271.2 ± 273.9	1,321.6 ± 470.2	NS
Vitamin D (µg/day)	Placebo	2.7 ± 2.2	3.7 ± 2.7	NS
	Fortified	3.1 ± 2.5	3.9 ± 3.3	NS
Vitamin C (mg/day)	Placebo	136.3 ± 62.0	200.6 ± 60.4	<0.001
	Fortified	122.5 ± 49.1	206.2 ± 81.7	<0.001
Vitamin K (µg/day)	Placebo	159.6 ± 148.4	151.0 ± 84.0	NS
	Fortified	117.8 ± 63.9	147.1 ± 149.3	NS

Values are presented as means with their standard deviations (*n* = 41). Time-point differences were analysed by repeated-measures ANOVA. Comparisons between placebo group and fortified group at each point were measured using one-sided tests (****p* ≤ 0.001)

Table 4 Iron and bone biomarkers of iron-deficient women consuming placebo and iron-fortified fruit juices during 16 weeks

	Group	Baseline	Week 8	Week 16	<i>p</i> time
Haemoglobin (g/dL)	Placebo	13.0 ± 0.8 ^a	13.4 ± 0.8 ^b	13.1 ± 0.7 ^a	0.02
	Fortified	13.3 ± 0.9 ^a	13.7 ± 0.9 ^{ab}	13.7 ± 0.7 ^{b**}	0.03
Serum ferritin (ng/mL)	Placebo	22.5 ± 13.7	26.4 ± 18.8	20.2 ± 14.6	NS
	Fortified	22.2 ± 11.6 ^a	34.1 ± 15.9 ^b	33.5 ± 16.9 ^{b*}	<0.001
Serum transferrin (mg/dL)	Placebo	315.7 ± 54.8	335.5 ± 59.5	307.8 ± 53.1	NS
	Fortified	318.7 ± 55.8 ^a	301.9 ± 57.0 ^b	282.3 ± 45.15 ^c	<0.001
Transferrin saturation (%)	Placebo	16.1 ± 7.5	20.3 ± 13.3	18.6 ± 15.8	NS
	Fortified	16.2 ± 7.1 ^a	21.1 ± 9.5 ^{ab}	21.7 ± 7.8 ^b	0.008
25 hydroxyvitamin D (nmol/L)	Placebo	53.3 ± 14.6 ^a	42.1 ± 11.0 ^b	38.6 ± 10.4 ^b	<0.001
	Fortified	48.2 ± 13.4 ^a	39.2 ± 11.5 ^b	36.5 ± 13.1 ^b	<0.001
PTH (pg/mL)	Placebo	37.6 ± 11.0	–	35.2 ± 14.5	NS
	Fortified	38.5 ± 18.6	–	33.3 ± 5.7	NS
Alkaline phosphatase (µg/L)	Placebo	10.3 ± 3.1	10.6 ± 2.2	10.7 ± 2.8	NS
	Fortified	12.0 ± 3.6	12.0 ± 2.9	12.5 ± 3.5	NS
NTX (nmol BCE/mmol creatinine)	Placebo	82.5 ± 33.4	86.7 ± 29.4	79.9 ± 23.9	NS
	Fortified	72.8 ± 31.3	82.5 ± 29.6	78.7 ± 30.1	NS

Values are presented as means with their standard deviations (*n* = 41). Within the same row, different letters indicate significant differences (ANOVA of repeated measures followed by Bonferroni's test). Comparisons between placebo group and fortified group at each point were measured using one-sided tests (**p* < 0.05; ***p* < 0.01)

D and 25-hydroxyvitamin D levels in our volunteers could be explained since the production of vitamin D in the skin through sunlight exposure is the main contributor to vitamin D status [29]. With respect to other nutrients related to bone health, dietary intakes reached the RDA. We observed adequate intakes of calcium, magnesium,

phosphorus, vitamin C and vitamin K, which are essential nutrients to maximise bone formation and minimise bone loss [30].

Very scarce data are available on simultaneous vitamin D and iron deficiency in humans. Two observational studies in children and adolescent immigrants from Africa

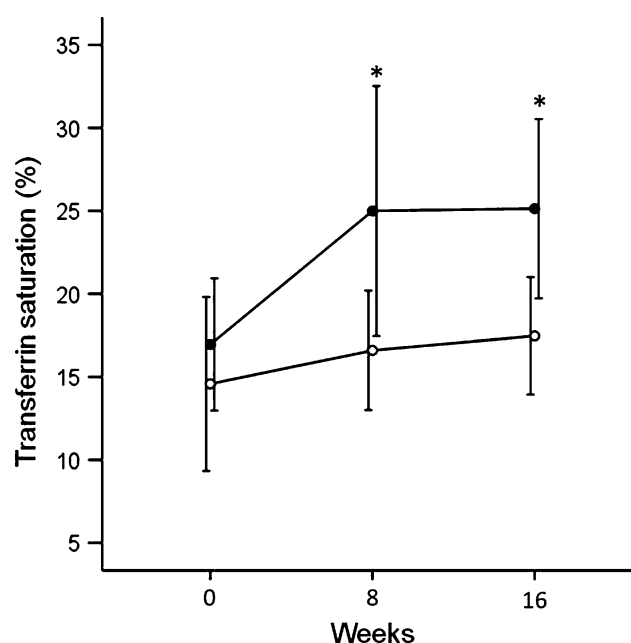


Fig. 1 Transferrin saturation at baseline, 8 and 16 weeks in volunteers that consumed the iron-fortified fruit juice depending on 25-hydroxyvitamin D levels: < 50 nmol/L (open circle) and ≥ 50 nmol/L (filled circle). Values are means with 95 % confident intervals expressed by vertical bars. Comparisons between volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels < 50 nmol/L and volunteers with 25-hydroxyvitamin D levels ≥ 50 nmol/L at each point were measured using one-sided tests (* $p \leq 0.05$)

and Asia to northern regions detected high prevalence of both deficiencies, which were associated with several factors such as skin pigmentation, covering clothes in females or malnutrition [3, 4]. But to the best of our knowledge, there are no data from controlled human studies in which the sample is selected as being iron deficient. Furthermore, no data are available on the possible influence of vitamin D status in iron recovery.

It is noteworthy that these young women with iron deficiency exhibited very low 25-hydroxyvitamin D levels. However, the improvement of iron status after the supplementation with the iron-fortified food did not increase 25-hydroxyvitamin D. Moreover, 25-hydroxyvitamin D levels after 16 weeks of treatment were lower than before supplementation (Table 4), most likely due to the reduction of UV light exposure produced in winter season at latitudes higher than 40° [31], since the study was performed from November to March in Madrid (Spain), and there were no differences in vitamin D intake. But, on the other hand, we found that even though the volunteers who consumed the iron-fortified fruit juice clearly improved their iron status, the recovery of transferrin saturation was lower if they had also vitamin D deficiency (Fig. 1). Therefore, the obtained results support the hypothesis that there is an association between vitamin D and iron status, although the nature of

this relationship and the underlying mechanism remains uncertain. Different studies attributed this connection to the role of iron in vitamin D activation [11, 15] and to vitamin D modulating the risk of anaemia by decreasing inflammation [5] and stimulating erythropoiesis [7]. More recent studies found a metabolic association between iron status and 25-hydroxyvitamin D levels through fibroblast growth factor 23 (FGF23) [32]. This hormone controls 1α -OHase enzyme expression, and its levels increase with low serum 25-hydroxyvitamin D [33]. One study in subjects with rickets showed that low serum iron and low haemoglobin were associated with elevated FGF23 and low 1,25-dihydroxyvitamin D [34]. However, there is a lack of evidence regarding aetiological mechanism, especially in healthy adults such as our volunteers.

Given the low levels of 25-hydroxyvitamin D found in these women, we expected the PTH levels would be higher than normal. When low 25-hydroxyvitamin D levels lead to reduced calcium levels, PTH is secreted causing an increase in bone resorption to correct hypocalcemia. This can have a negative influence on bone mass, preventing the maximum peak bone mass from being reached, which is very important in order to avoid the development of osteoporosis after menopause [35]. Nevertheless, levels of PTH and bone remodelling markers are considered to be in the normal range in these volunteers. Our research group observed that postmenopausal osteoporotic women with low 25-hydroxyvitamin D levels presented a higher decrease in bone mass than postmenopausal osteoporotic women with normal levels of 25-hydroxyvitamin D [36]. This fact has been described by other authors [37]. In a similar way, in a recent work, we found that levels of 25-hydroxyvitamin D lower than 18 ng/ml produced hyperparathyroidism (PTH > 65 pg/ml) in a high percentage of postmenopausal women [38]. However, in the present study, although approximately 50 % of the women at baseline and 75 % at the end of the study presented 25-hydroxyvitamin D < 45 nmol/L (< 18 ng/ml), their PTH levels were not higher than the upper limit of normality. In agreement, another study performed in young people living in a sunny place did not observe an increased in PTH levels associated with low 25-hydroxyvitamin D levels [39]. Some studies suggested that different factors could have an influence in the PTH and 25-hydroxyvitamin D relationship. For the same levels of 25-hydroxyvitamin D, higher age and BMI have been related to higher levels of PTH [40, 41]. Therefore, this lack of relation between low levels of 25-hydroxyvitamin D and high levels of PTH observed in our volunteers could be explained as they were young and normal-weight women.

With respect to bone turnover markers, studies that established their reference ranges for menstruating women excluded those under 30 years [42]. Given that the mean

age of the women that participated in the study was 25 years, it was difficult to classify them in a range of normality. Compared with other data of the bibliography, bone turnover markers were higher than data observed in premenopausal women with higher or similar age [43, 44]. It is known that bone turnover in women is elevated until skeletal maturity is reached, usually in the 3rd decade of life, thus the women participating in the present study were expected to have a high rate of bone remodelling, which explains the present results.

We found no relationship between iron levels and bone biomarkers, in contrast to data obtained in animal models about deleterious effects on bone in anaemic rats [11–13]. The biochemical markers of bone formation and bone resorption remained stable independently of iron status. The obtained results could be explained by the fact that our volunteers presented iron deficiency without anaemia and were young, so bone formation may prevail over bone resorption. However, it could be hypothesised that continued iron deficiency may result in substantial bone loss and higher risk of osteoporosis. In this sense, one study in postmenopausal women found that osteoporotic patients who have suffered from fragility fracture presented lower iron status than other osteoporotic women with no fractures and control women [15]. Therefore, it would be very interesting to investigate whether iron deficiency, maintained during years, could predispose to osteoporosis.

Another important issue is that the maintenance of an adequate iron and vitamin D status is essential for integral health. Iron deficiency may affect physical and cognitive performance, immunity and temperature regulation [27]. Vitamin D deficiency has been related to an increased risk of many chronic illnesses, including common cancers, autoimmune diseases, infectious diseases and cardiovascular disease [45]. These actions not only depend on renal 1 α -OHase activity, but on extra-renal 1 α -OHase mediated by vitamin D receptors distributed in many tissues [46]. Iron acts as a cofactor of all 1 α -OHases, and the activity of the extra-renal hydroxylases is regulated by the concentration of the substrate, 25-hydroxyvitamin D [47]. Therefore, low iron and 25-hydroxyvitamin D levels could lead to different health disorders derived from the low activity of body extra-renal 1 α -OHases.

The prevalence of iron deficiency in young menstruating women is highly frequent. According to our results, this situation could be accompanied by low levels of 25-hydroxyvitamin D, which can obstruct the recovery of iron status. Although bone health does not seem to be affected in this group of women, correction of iron deficiency and low 25-hydroxyvitamin D levels is an issue of great importance in the context of public health. Therefore, clinical and/or nutritional interventions should be considered in order to maintain adequate levels of vitamin D and iron.

Further studies should be carried out in anaemic and non-anaemic subjects to clarify the possible interactions between iron and vitamin D metabolism, and the possible health effects that these two deficiencies could have, taking into account also the modulating effects of diet and genetic polymorphisms. Present results add new information regarding the influence of 25-hydroxyvitamin D levels on iron status recovery but other studies should be carried out to confirm whether the improvement of 25-hydroxyvitamin D leads to better recovery of iron status in response to iron-fortified food or supplements. It is also important to study the effect of iron deficiency on bone turnover after the skeletal maturity is reached and to perform prospective studies in pre- and postmenopausal women, with and without osteoporosis. Finally, the possible effect that iron and vitamin D deficiencies can have on extra-renal 1 α -OHase functionality and their repercussions on health should be studied.

Acknowledgments The authors are grateful to I. Wright for technical support. This study was supported by Project AGL2009-11437 and Grupo Leche Pascual. R. Blanco-Rojo and L. Toxqui were supported by a JAE-predoc grant from CSIC and European Social Found.

References

- Holick MF, Chen TC (2008) Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87(4):1080S–1086S
- Bendich A (2010) Iron deficiency and overload. Humana Press, New York
- McGillivray G, Skull SA, Davie G, Kofoed SE, Frydenberg A, Rice J, Cooke R, Carapetis JR (2007) High prevalence of asymptomatic vitamin D and iron deficiency in East African immigrant children and adolescents living in a temperate climate. *Arch Dis Child* 92(12):1088–1093. doi:10.1136/adc.2006.112813
- Grindulis H, Scott PH, Belton NR, Wharton BA (1986) Combined deficiency of iron and vitamin D in Asian toddlers. *Arch Dis Child* 61(9):843–848
- Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, Rasgon SA (2010) Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 89(5):447–452. doi:10.1007/s00277-009-0850-3
- Tanaka H, Teitelbaum SL (1990) Vitamin D regulates transferrin receptor expression by bone marrow macrophage precursors. *J Cell Physiol* 145(2):303–309. doi:10.1002/jcp.1041450215
- Norman AW (2006) Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147(12):5542–5548. doi:10.1210/en.2006-0946
- Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78(4):1193–1231
- DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80(6 Suppl):1689S–1696S
- Knott L, Bailey AJ (1998) Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22(3):181–187
- Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2006) Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone

- mineral density in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(10):2547–2550
12. Parelman M, Stoecker B, Baker A, Medeiros D (2006) Iron restriction negatively affects bone in female rats and mineralization of hFOB osteoblast cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 231(4):378–386
 13. Diaz-Castro J, Lopez-Frias MR, Campos MS, Lopez-Frias M, Alferez MJ, Nestares T, Ojeda ML, Lopez-Aliaga I (2011) Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats. *Eur J Nutr*. doi:[10.1007/s00394-011-0212-5](https://doi.org/10.1007/s00394-011-0212-5)
 14. Ilich-Ernst JZ, McKenna AA, Badenhop NE, Clairmont AC, Andon MB, Nahhas RW, Goel P, Matkovic V (1998) Iron status, menarche, and calcium supplementation in adolescent girls. *Am J Clin Nutr* 68(4):880–887
 15. D'Amelio P, Cristofaro MA, Tamone C, Morra E, Di Bella S, Isaia G, Grimaldi A, Gennero L, Gariboldi A, Ponzetto A, Pescarmona GP, Isaia GC (2008) Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone* 43(6):1010–1015. doi:[10.1016/j.bone.2008.08.107](https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.107)
 16. Blanco-Rojo R, Perez-Granados AM, Toxqui L, Gonzalez-Vizcayno C, Delgado MA, Vaquero MP (2011) Efficacy of a microencapsulated iron pyrophosphate-fortified fruit juice: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in Spanish iron-deficient women. *Br J Nutr* 105(11):1652–1659. doi:[10.1017/S0007114510005490](https://doi.org/10.1017/S0007114510005490)
 17. Institute of Medicine (2001) Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Food and Nutrition Board, Washington DC
 18. de Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, Hautvast JG (1996) Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA study. *Eur J Clin Nutr* 50(Suppl 2):S123–S124
 19. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Vaquero MP (2009) An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young iron-deficient women. *Br J Nutr* 102(4):546–553. doi:[10.1017/S0007114509220794](https://doi.org/10.1017/S0007114509220794)
 20. DIAL (2010) Alce Ingeniería, Spain
 21. Rodriguez Sangrador M, Beltran de Miguel B, Cuadrado Vives C, Moreiras Tuny O (2010) Influence of sun exposure and diet to the nutritional status of vitamin D in adolescent Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project)]. *Nutr Hosp* 25(5):755–762
 22. Groba MV, Miravalle A, Gonzalez Rodriguez E, García Santana S, Gonzalez Padilla E, Saavedra P, Soria A, Sosa M (2010) Factors related to vitamin D deficiency in medical students in Gran Canaria. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 2:11–18
 23. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2011) Tablas de composición de alimentos. 15 ampliada y revisada edn
 24. Cuervo M, Corbalan M, Baladia E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C, Lorenzo H, Polanco I, Quiles J, Romero de Avila MD, Russolillo G, Villarino A, Alfredo Martinez J (2009) Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp* 24(4):384–414
 25. Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP (2009) Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem* 65(2):165–174
 26. Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, Buil A, Arroyo-Pardo E, Soria JM, Vaquero MP (2011) Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. *Nutr Metab (Lond)* 8:69. doi:[10.1186/1743-7075-8-69](https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-69)
 27. Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP (2010) Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 25(3):350–365
 28. Roman Vinas B, Ribas Barba L, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, Cavelaars A, de Groot LC, Van't Veer P, Matthys C, Serra Majem L (2011) Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in Europe. *Ann Nutr Metab* 59(2–4):84–95. doi:[10.1159/000332762](https://doi.org/10.1159/000332762)
 29. Lips P (2010) Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121(1–2):297–300. doi:[10.1016/j.jsbmb.2010.02.021](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.021)
 30. Mesias M, Seiquer I, Navarro MP (2011) Calcium nutrition in adolescence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51(3):195–209. doi:[10.1080/10408390903502872](https://doi.org/10.1080/10408390903502872)
 31. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357(3):266–281. doi:[10.1056/NEJMr070553](https://doi.org/10.1056/NEJMr070553)
 32. Durham BH, Joseph F, Bailey LM, Fraser WD (2007) The association of circulating ferritin with serum concentrations of fibroblast growth factor-23 measured by three commercial assays. *Ann Clin Biochem* 44(Pt 5):463–466. doi:[10.1258/000456307781646102](https://doi.org/10.1258/000456307781646102)
 33. Prie D, Friedlander G (2010) Reciprocal control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system. *Clin J Am Soc Nephrol* 5(9):1717–1722. doi:[10.2215/CJN.02680310](https://doi.org/10.2215/CJN.02680310)
 34. Imel EA, Peacock M, Gray AK, Padgett LR, Hui SL, Econs MJ (2011) Iron modifies plasma FGF23 differently in autosomal dominant hypophosphatemic rickets and healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 96(11):3541–3549. doi:[10.1210/jc.2011-1239](https://doi.org/10.1210/jc.2011-1239)
 35. Lips P (2001) Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22(4):477–501
 36. Alcoba LM, Cabeza B, Castaño-Milla C, Castaño de la Mota MJ, Matías MJ, Sanchez-Pernaute O, de la Piedra C (2006) Patrón clínico y bioquímico de los pacientes con elevación de la hormona paratiroidea (PTH) en una cohorte de 103 casos de osteoporosis. *Revista española de enfermedades metabólicas óseas* 15:115
 37. Hollis BW (2005) Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 135(2):317–322
 38. Ahijado P, Rubert M, Zazo P, Mahillo I, de la Piedra C (2010) Hiperparatiroidismo secundario asociado a un déficit de vitamina D. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 2:16
 39. Gonzalez-Padilla E, Soria Lopez A, Gonzalez-Rodriguez E, García-Santana S, Mirallave-Pescador A, Groba Marco Mdel V, Saavedra P, Quesada Gomez JM, Sosa Henriquez M (2011) High prevalence of hypovitaminosis D in medical students in Gran Canaria, Canary Islands (Spain). *Endocrinol Nutr* 58(6):267–273. doi:[10.1016/j.endonu.2011.03.002](https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.03.002)
 40. Maetani M, Maskarinec G, Franke AA, Cooney RV (2009) Association of leptin, 25-hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in women. *Nutr Cancer* 61(2):225–231. doi:[10.1080/01635580802455149](https://doi.org/10.1080/01635580802455149)
 41. Gonzalez-Molero I, Morcillo S, Valdes S, Perez-Valero V, Botas P, Delgado E, Hernandez D, Oliveira G, Rojo G, Gutierrez-Repiso C, Rubio-Martin E, Menendez E, Soriguer F (2011) Vitamin D deficiency in Spain: a population-based cohort study. *Eur J Clin Nutr* 65(3):321–328. doi:[10.1038/ejcn.2010.265](https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.265)
 42. Glover SJ, Garner P, Naylor K, Rogers A, Eastell R (2008) Establishing a reference range for bone turnover markers in

- young, healthy women. *Bone* 42(4):623–630. doi:[10.1016/j.bone.2007.12.218](https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.12.218)
43. Ardawi MS, Maimani AA, Bahksh TA, Rouzi AA, Qari MH, Raddadi RM (2010) Reference intervals of biochemical bone turnover markers for Saudi Arabian women: a cross-sectional study. *Bone* 47(4):804–814. doi:[10.1016/j.bone.2010.07.017](https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.07.017)
44. Del Campo MT, Gonzalez-Casaus ML, Aguado P, Bernad M, Carrera F, Martinez ME (1999) Effects of age, menopause and osteoporosis on free, peptide-bound and total pyridinium cross-link excretion. *Osteoporos Int* 9(5):449–454
45. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J (2010) The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 25(9):2850–2865. doi:[10.1093/ndt/gfq313](https://doi.org/10.1093/ndt/gfq313)
46. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, Modlin RL, Adams JS (2007) Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103(3–5):316–321. doi:[10.1016/j.jsbmb.2006.12.078](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.078)
47. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zugel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311(5768):1770–1773. doi:[10.1126/science.1123933](https://doi.org/10.1126/science.1123933)

RESULTADOS NO PUBLICADOS

1 Asociación entre la presencia del SNP rs3811647 y la respuesta a la ingesta de un alimento fortificado con hierro en mujeres con deficiencia de hierro.

El objetivo de este ensayo fue estudiar si la presencia del SNP rs3811647 influía en la respuesta a la ingesta de un alimento fortificado con hierro en un grupo de mujeres con deficiencia de hierro.

Se reclutó un grupo de 122 mujeres en edad fértil con deficiencia de hierro (definida como ferritina <40 ng/mL y hemoglobina \geq 11g/dL), con los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos en el apartado 2.1 de la sección *Resumen de los estudios realizados y metodología empleada*. Las voluntarias participaron en un estudio de intervención aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo; de 16 semanas de duración con un alimento fortificado con hierro. Las participantes fueron divididas de forma aleatoria en dos grupos. Un grupo consumió, como parte de su dieta habitual, 500 mL de un zumo fortificado (grupo F, n=64); mientras que el otro grupo consumió 500 mL de un zumo placebo (grupo P, n=58). El zumo fortificado aportaba 18 mg de hierro por ración diaria (envase de 500 mL) en forma de pirofosfato férrico micro-encapsulado con lecitina. Al inicio y cada cuatro semanas, se determinaron los valores de hemoglobina, ferritina sérica y transferrina sérica de las voluntarias. Se realizó el genotipado del SNP rs3811647 mediante la técnica de minisecuenciación descrita previamente (Bertoncini et al., 2011). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas, utilizando el grupo (P o F) y el genotipo (AA, AG y GG) como factores inter-sujetos.

En el grupo P, 26 voluntarias presentaron el genotipo GG, 28 el genotipo AG y 3 el genotipo AA. En el grupo F, 35 voluntarias presentaron el genotipo GG, 25 el genotipo AG y 5 el genotipo AA. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

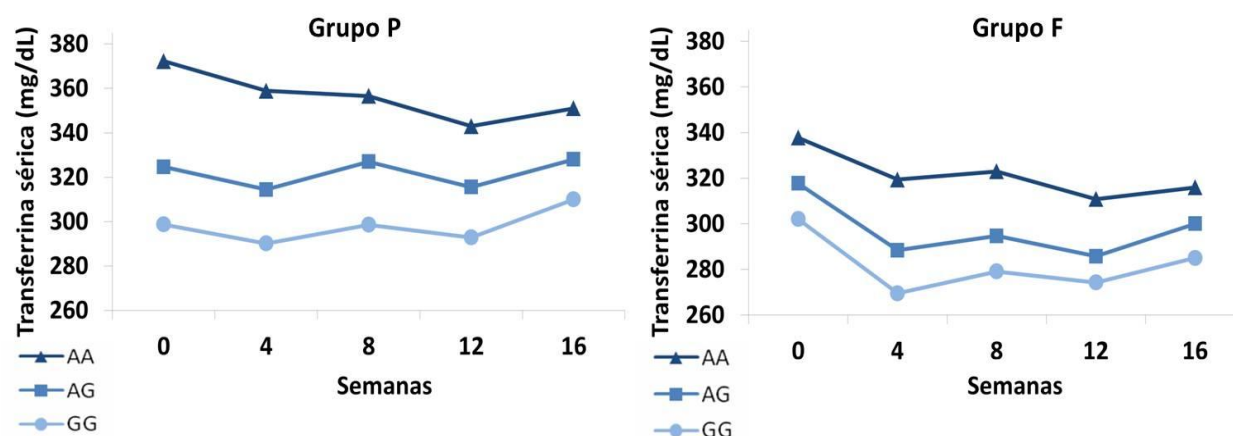


Figura 1. Cambios en la transferrina sérica en mujeres con deficiencia de hierro que tomaron el zumo placebo (Grupo P) o el zumo fortificado con hierro (Grupo F) según su genotipo.

Se observó que el SNP rs3811647 estaba relacionado con los valores de transferrina sérica, pero no con los valores de hemoglobina y ferritina sérica. La figura 1 muestra los cambios en los niveles de transferrina sérica durante la intervención según el genotipo. Se observaron diferencias significativas por efecto del tiempo ($p < 0.001$) y se encontró un efecto significativo del grupo ($p = 0.05$) y del genotipo ($p < 0.05$); pero no se encontraron interacciones significativas tiempo x grupo, tiempo x genotipo, tiempo x grupo x genotipo, ni grupo x genotipo.

Se concluye que todas las voluntarias respondieron al alimento fortificado reduciendo sus niveles de transferrina sérica y no existió una interacción dieta-gen, aunque las mujeres que presentaban la mutación mantuvieron la transferrina sérica en niveles más altos durante las 16 semanas del ensayo, lo que sugiere que esta mutación influye en la concentración de la proteína transportadora de hierro independientemente del consumo del alimento funcional.

2 Determinación de las pérdidas menstruales y del uso de anticonceptivos hormonales en un grupo de mujeres en edad fértil y asociación con su estado de hierro.

El objetivo de este estudio fue valorar las pérdidas menstruales y el uso de anticonceptivos hormonales en un grupo de mujeres en edad fértil con deficiencia de hierro mediante un cuestionario diseñado específicamente para tal fin, y conocer si existía asociación entre dichos parámetros y el estado del hierro.

Para ello, un grupo de 124 mujeres (ferritina <40 ng/mL y hemoglobina ≥ 11 g/dL) con los criterios de inclusión y exclusión previamente detallados, participó en este ensayo de 16 semanas de duración. Al inicio, rellenaron un cuestionario ginecológico general que contenía preguntas acerca de la edad de menarquia, si tomaban anticonceptivos hormonales, y si su ciclo era regular o no. Además, al inicio y cada cuatro semanas se les pidió que anotaran en el cuestionario la duración de su última menstruación, los días de más intensidad y el número de compresas o tampones que habían utilizado en el día de mayor intensidad. También se determinaron los valores de hemoglobina, ferritina sérica, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), transferrina sérica, hierro sérico, saturación de la transferrina, zinc protoporfirina (ZnPP), receptor soluble de la transferrina (sTfR), índice distribución de hematíes y el *body iron* de las voluntarias al inicio del estudio.

Se trabajó con los datos de los 5 cuestionarios obteniéndose para cada voluntaria la media de la duración del ciclo menstrual (días), la duración de la menstruación (días), los días intensos de la menstruación y el número de compresas o tampones utilizados en los días de mayor intensidad de cada voluntaria. Posteriormente, se calculó la media del número de reglas al año, el número de compresas o tampones utilizados anualmente en días de mayor intensidad y el número de compresas o tampones utilizados en días de menor intensidad al año. Éste último dato se calculó de forma teórica, teniendo en cuenta que entre el 75 y el 90% de las pérdidas menstruales se producen en los días de mayor intensidad (The Menorrhagia Research Group, 2004). Se asumió que el número de compresas o tampones utilizados en los días de menor intensidad era el 15% del número utilizado en el día de mayor

intensidad. Por tanto, el cálculo fue: Número de compresas o tampones utilizados en días de menor intensidad al año = Número de compresas o tampones utilizados el día de mayor intensidad al año \times 0.15 \times (duración de la menstruación (días) - días intensos de la menstruación) \times número de reglas al año. El coeficiente total de pérdidas menstruales refleja el número estimado de compresas o tampones utilizados al año por cada voluntaria.

La edad media de las voluntarias era 24.3 ± 4.6 años y el índice de masa corporal 21.7 ± 2.3 kg/m². Los datos se dividieron en función de si las voluntarias utilizaban o no anticonceptivos hormonales, y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias entre los parámetros ginecológicos y de determinación de pérdidas menstruales y los parámetros del estado de hierro entre estos dos grupos. Se consideraron significativas las diferencias con una $p < 0.05$. Una voluntaria fue excluida ya que sólo tuvo un periodo menstrual en las 16 semanas.

Tabla 1. Parámetros ginecológicos y de determinación de pérdidas menstruales de un grupo de mujeres con deficiencia de hierro según el uso o no de anticonceptivos hormonales.

	Usan anticonceptivos hormonales (n=43)	No usan anticonceptivos hormonales (n=80)	ANOVA
Edad menarquia (años)	12.5 ± 1.2	12.6 ± 1.4	NS
Duración ciclo menstrual (días)	27.9 ± 1.4	29.4 ± 5.1	NS
Duración de la menstruación (días)	4.4 ± 0.8	5.0 ± 1.1	$p=0.002$
Días intensos de la menstruación	1.8 ± 0.6	2.1 ± 0.7	$p=0.03$
Número de compresas o tampones utilizados en el día de mayor intensidad	4.6 ± 1.3	5.4 ± 1.5	$p=0.008$
Número de menstruaciones al año	13.1 ± 0.8	12.7 ± 2.5	NS
Número de compresas o tampones utilizados en días de mayor intensidad al año	115.6 ± 86.5	149.2 ± 90.0	$p=0.04$
Número de compresas o tampones utilizados en días de menor intensidad al año	24.1 ± 8.0	31.0 ± 15.1	$p=0.006$
Coeficiente total pérdidas menstruales	139.8 ± 91.7	180.2 ± 100.8	$p=0.03$

Los datos están presentados como media \pm desviación estándar

Como se puede observar en la tabla 1, no se encontraron diferencias en la edad de la menarquia ni en la duración del ciclo menstrual en función del uso de anticonceptivos hormonales. Sin embargo, las mujeres que los utilizaban presentaron una duración menor de la menstruación, menor número de días intensos y utilizaron un menor número de compresas o tampones el día de mayor intensidad respecto a las mujeres que no los utilizaban ($p=0.002$, $p=0.03$ y $p=0.008$ respectivamente). En consonancia, no se obtuvieron diferencias en el número de menstruaciones anuales, pero si en el número de compresas o tampones utilizados en los días de mayor y de menor intensidad al año ($p=0.04$ y $p=0.006$ respectivamente). Por último, se observó que el coeficiente total de pérdidas menstruales era significativamente menor en las mujeres que usaban anticonceptivos hormonales comparado con el de las mujeres que no los utilizaban ($p=0.03$).

Tabla 2. Parámetros hematológicos y bioquímicos del estado de hierro de un grupo de mujeres con deficiencia de hierro según el uso o no de anticonceptivos hormonales.

	Usan anticonceptivos hormonales (n=43)	No usan anticonceptivos hormonales (n=80)	ANOVA
Hemoglobina (g/dl)	13.3±.9	13.2±.9	NS
Ferritina sérica (ng/ml)	26.0±17.1	26.5±17.7	NS
Hematocrito (%)	39.4±2.8	39.0±2.9	NS
VCM (fl.)	86.9±4.4	87.1±5.2	NS
Transferrina sérica (mg/dl)	360.7±62.6	290.1±42.0	$p<0.001$
Hierro (µg/dl)	92.4±43.2	77.9±34.7	$p=0.045$
Saturación de la transferrina (%)	19.1±10.2	19.6±9.2	NS
ZnPP (µg ZnPP/g Hb)	2.9±.9	3.1±1.1	NS
sTfR (µg/ml)	1.3±.3	1.5±.6	$p=0.034$
Índice distribución hematíes (%)	12.6±.8	13.0±1.2	NS
Body iron (mg/kg)	8.5±3.0	8.3±3.4	NS

Los datos están presentados como media ± desviación estándar

La tabla 2 presenta los parámetros del estado de hierro. Se observó que los niveles de transferrina sérica y de hierro sérico eran significativamente mayores en las mujeres que usaban los anticonceptivos hormonales respecto a las que no los usaban ($p < 0.001$ y $p = 0.045$ respectivamente), mientras que los niveles de sTfR eran significativamente menores en las primeras que en las segundas ($p = 0.034$). No se encontraron diferencias en los demás parámetros del estado de hierro analizados.

En conclusión, las mujeres que utilizan los anticonceptivos hormonales tienen menores pérdidas menstruales que las que no los utilizan, lo cual coincide con la literatura (Iyer et al., 2000). Además, estas mujeres parecen tener mejor estado de hierro, ya que presentan menores niveles de sTfR y mayores niveles de hierro sérico, lo que se corresponde con resultados obtenidos por otros autores, que encontraron que el uso de anticonceptivos hormonales está asociado con un menor riesgo de deficiencia de hierro (Milman et al., 1993; Harvey et al., 2005). Aunque en nuestro estudio no se encontraron diferencias en el hierro funcional (hemoglobina) ni en los almacenes de hierro (ferritina ni *body iron*), la concentración de transferrina sérica en las mujeres que usan anticonceptivos hormonales está claramente aumentada, lo que no correspondería con su mejor estado de hierro. Estos datos coinciden con los de otros autores que encontraron niveles de transferrina sérica más elevados en las mujeres usuarias de anticonceptivos hormonales respecto a las no usuarias, independientemente de su estado de hierro (Frassinelli-Gunderson et al., 1985; Casabellata et al., 2007). Curiosamente, los únicos datos disponibles en la literatura que podrían aportar una explicación son antiguos, y sugieren que este aumento en la transferrina sérica puede deberse a los estrógenos contenidos en los anticonceptivos, ya que se ha visto en modelos animales que las hormonas esteroideas pueden regular la transcripción de transferrina en hígado (McKnight et al., 1980).

3 Relación entre la presencia del SNP rs3811647, el uso de anticonceptivos hormonales y la ingesta de hierro hemo, y los parámetros del estado del hierro en mujeres con predisposición a anemia ferropénica

Con el fin de determinar la influencia de los factores clave de tipo dietético, genético y fisiológico en el estado de hierro de un grupo de mujeres con predisposición a anemia, se seleccionaron aquellos factores que presentaron, en los diferentes estudios realizados, una mayor relación con los parámetros del metabolismo del hierro. Como factor dietético se escogió la ingesta de hierro hemo, como factor genético la presencia del SNP rs3811647 y como factor fisiológico el uso de anticonceptivos hormonales. Se analizaron los siguientes parámetros del estado de hierro: hemoglobina, ferritina sérica, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), transferrina sérica, hierro sérico, saturación de la transferrina, zinc protoporfirina (ZnPP), receptor soluble de la transferrina (sTfR), índice distribución de hematíes y *body iron*.

Se realizó un análisis de regresión lineal multivariante por el método *stepwise* de cada parámetro bioquímico y hematológico (variables dependientes), utilizando la ingesta de hierro hemo (mg/día), el genotipo (AA, AG y GG) y el uso o no de anticonceptivos hormonales como variables independientes. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Tras el análisis estadístico de los datos, se encontró que los 3 factores independientes se relacionaban con los niveles de sTfR ($R^2 = 0.079$), ferritina sérica ($R^2 = 0.048$), hierro sérico ($R^2 = 0.069$) y saturación de la transferrina ($R^2 = 0.044$). La variable con la que se encontró una relación más significativa fue con la transferrina sérica, obteniéndose una $R^2 = 0.386$. En la tabla 1 se muestra la R^2 ajustada con los valores $F_{a,b}$ y la p del modelo obtenido usando el método *stepwise*; así como los coeficientes de regresión β con sus errores estándar, y los valores t y p de cada factor para el modelo de regresión lineal multivariante de la transferrina sérica.

Tabla 1. Modelo de regresión lineal multivariante de la transferrina sérica (n=119, $R^2=0.386$, R^2 ajustada=0.370, $F_{a,b}=3,115$ y $p<0.001$)

	β (SE)	t-valor	p-valor
Anticonceptivos hormonales	-67.87(8.97)	-7.56	<0.001
rs3811647	24.70(6.96)	3.55	0.001
Hierro hemo	-15.38(6.35)	-2.42	0.017

Como se puede observar en la tabla 1, el factor que más influye es el uso de anticonceptivos hormonales, ya que presenta el coeficiente β más elevado y una $p<0.001$, siendo las mujeres que utilizan este tipo de anticonceptivos las que presentan valores de transferrina más elevados. El segundo factor más influyente es la presencia del SNP rs3811647 ($p=0.001$), mostrando valores más altos de transferrina aquellas que presentaban el alelo mutado. Por último, una menor ingesta de hierro hemo supone una mayor concentración de transferrina sérica ($p=0.017$).

Además, en el caso de la transferrina sérica se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando los 3 factores como factores inter-sujetos para comprobar si existían interacciones entre ellos. No se encontraron interacciones significativas entre hierro hemo x genotipo, hierro hemo x anticonceptivos hormonales, genotipo x anticonceptivos hormonales ni hierro hemo x anticonceptivos hormonales x genotipo.

La figura 1 muestra un gráfico en 3D donde se representa en el eje Y los valores de transferrina sérica, en el eje X el genotipo y en el eje Z la ingesta de hierro hemo. El uso de anticonceptivos hormonales se representa mediante diferentes símbolos. Para facilitar la visualización, también se han señalado los diferentes genotipos en distintos colores. Como puede observarse, una menor ingesta de hierro hemo, el uso de anticonceptivos hormonales y la presencia de alelo mutado del SNP rs3811647 suponen una mayor concentración de transferrina sérica, actuando estos valores de forma independiente y no interaccionando entre ellos.

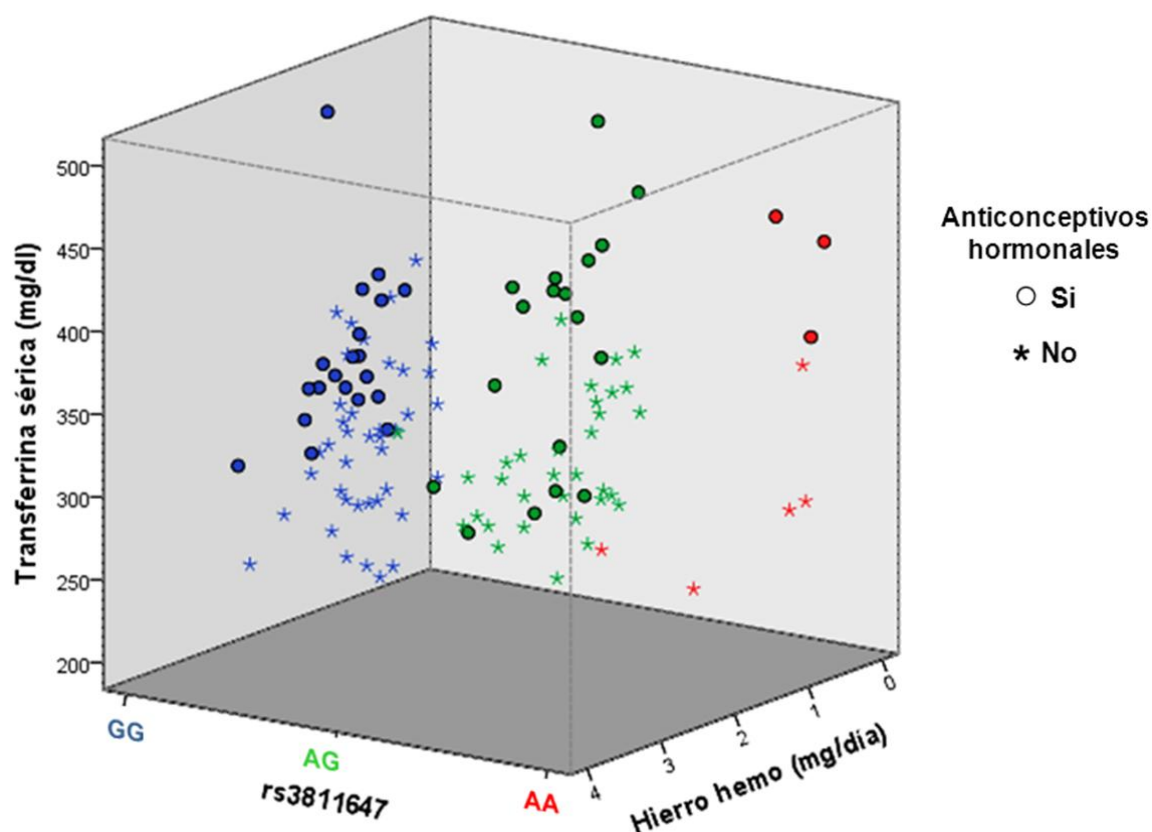


Figura 1. Gráfico representativo en 3D del modelo de regresión lineal multivariante de la transferrina sérica

Todo ello indica que un alto porcentaje de la variabilidad de la transferrina sérica (38.6%) es explicado por estos 3 factores, la ingesta de hierro hemo, el uso de anticonceptivos hormonales y la presencia del SNP rs3811647. Estos factores no interaccionan entre ellos, por lo que influyen de manera independiente en la variabilidad de la transferrina, ejerciendo un efecto acumulativo o compensatorio sobre la concentración de la misma. Este es el primer estudio en el que se presenta la influencia de factores propios del individuo junto con la influencia de factores ambientales sobre el estado del hierro en mujeres en edad fértil, y abre una nueva perspectiva de aplicación en un futuro cercano para la prevención de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica.

DISCUSIÓN GENERAL

Las causas de la deficiencia de hierro son multifactoriales y por ello la anemia ferropénica sigue siendo un problema a nivel mundial, y su prevención una prioridad de los organismos internacionales (WHO, 2001).

El factor dietético es fundamental, ya que cuando el aporte de hierro a través de la dieta es insuficiente o de baja biodisponibilidad para cubrir las necesidades corporales, aumenta el riesgo de ferropenia (Vaquero, 2011). Otro factor es el genético, y en relación al hierro se conoce mucho mejor la implicación de variantes genéticas asociadas a sobrecarga de hierro que a deficiencia (Camaschella y Strati, 2010). Por último, la situación fisiológica supone un incremento del riesgo de deficiencia en determinados colectivos, como es el caso de las mujeres en edad fértil, por las pérdidas de hierro ocasionadas por la menstruación (IOM, 2001). Estos factores normalmente se estudian de forma aislada, pero en la mayoría de los casos coexisten, por lo que la determinación de la influencia conjunta de todos ellos es de gran interés para conseguir la prevención de la deficiencia de hierro y de la anemia ferropénica.

La primera parte de esta Tesis Doctoral se centra en la identificación de posibles marcadores genéticos relacionados con la deficiencia de hierro y la anemia ferropénica. El estudio de asociación mostró que 4 de los 10 SNPs analizados explicaban el 35% de la variabilidad genética o heredabilidad de la transferrina sérica en mujeres en edad fértil. Las mutaciones C282Y y H63D del gen *HFE*, así como el alelo minoritario del SNP rs1799852 del gen de la transferrina (*Tf*), se relacionan con concentraciones inferiores de transferrina sérica; mientras que la presencia del alelo minoritario del SNP rs3811647, situado también en el gen *Tf*, se asocia con niveles más elevados de transferrina sérica y más bajos de la saturación de transferrina. Es decir, las tres primeras variantes se relacionarían con protección y la cuarta con predisposición a anemia ferropénica. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras poblaciones (Benyamin et al., 2009a; Benyamin et al., 2009b; McLaren et al. 2011), si bien nuestro estudio es el primero que encuentra esta asociación en mujeres en edad fértil, una población con alto riesgo de anemia ferropénica. Además, describimos por primera vez que la mutación H63D también se asocia con los niveles de transferrina sérica, lo que

es bastante interesante teniendo en cuenta la elevada frecuencia de dicha mutación en población Mediterránea (Merryweather-Clarke et al., 1997). En definitiva, las mujeres portadoras del alelo mutado del SNP rs3811647 presentan una reducción del transporte de hierro a los tejidos, lo que puede ser indicativo de mayor riesgo de anemia ferropénica. Otro punto importante es el hallazgo de interacciones gen-gen entre estos SNPs, de modo que la presencia de una variante que se asocia con elevación de la transferrina se compensa con la de otra asociada con disminución de sus niveles, por lo que estas variantes genéticas podrían ser utilizadas como marcadores potenciales de riesgo de ferropenia.

Para profundizar en los resultados obtenidos con el SNP rs3811647, se planteó la hipótesis de que este SNP, que no está localizado en una zona codificante sino en el intrón 11 del gen *Tf*, podría modular la expresión de este gen en el hepatocito. Para ello, se realizó un estudio en células Hep3B determinándose la expresión del gen *Tf* mediante el ensayo de la luciferasa. Se observó que la presencia del alelo mutado (A) de este SNP suponía una elevación significativa de la expresión del gen *Tf* respecto a la presencia del alelo no mutado (G), lo que explicaría la asociación entre la presencia del alelo A y los valores elevados de transferrina sérica observados en distintas poblaciones (Benyamin et al., 2009a; Benyamin et al., 2009b; McLaren et al. 2011), incluidas nuestras voluntarias, como se ha presentado anteriormente. Por tanto, el SNP rs3811647 parece tener un papel modulador de la transcripción del gen *Tf*. Aunque se desconoce el mecanismo, una posible explicación es que la presencia de A podría constituir un sitio de unión del factor de transcripción *Nuclear Factor-1* (NF-1). Se conoce que el NF-1 participa en la transcripción del gen *Tf* en el hígado (Zakin et al., 2002), aunque su acción conjunta con el SNP rs3811647 debe ser determinada.

Otro de los factores que tienen influencia en el desarrollo de la deficiencia de hierro es el dietético. Por ello, nos propusimos valorar la dieta habitual de un grupo de mujeres en edad fértil, y relacionarla con su estado de hierro. No se encontró una asociación entre la ingesta de hierro total y la ferritina sérica, el indicador de los almacenes del micronutriente; pero sí que se observó una relación directa entre la ingesta de hierro hemo y este marcador. Es bastante

destacable el hecho de que, a pesar de que el hierro hemo se ingirió en bajas cantidades (sólo supuso el 10% del hierro total), resultó ser un factor determinante en el estado de los almacenes de hierro de estas voluntarias, lo que se explicaría por su elevada biodisponibilidad, ya que su absorción no se ve tan drásticamente afectada por la presencia de otros componentes de la dieta (Hurrell y Egli, 2010). Otros autores han observado la misma relación entre el hierro hemo y la ferritina en mujeres con una ingesta de hierro hemo similar a la de las voluntarias participantes en el presente estudio (aproximadamente 1 mg/día) (Galán et al., 1998), aunque para ingestas inferiores esta asociación no se ha demostrado (Pynaert et al., 2007; Asakura et al., 2009). En este sentido, son especialmente relevantes los estudios que comparan la ingesta del mineral en mujeres vegetarianas frente a omnívoras, en los que no se encontraron diferencias en la ingesta total de hierro pero sí en la de hierro hemo, presentando mejor estado de hierro las mujeres omnívoras (Reddy y Sanders, 1990; Alexander et al., 1994; Ball y Bartlett 1999).

Por otro lado, hemos observado que el consumo de carne roja pero no el de carne blanca o el de productos cárnicos se asocia con un mejor estado de hierro. El resultado concerniente a los productos cárnicos resultó bastante inesperado, ya que estos productos se elaboran fundamentalmente a partir de carne roja (con alto contenido en hierro hemo). Además, nuestros resultados aportan nueva información, ya que la mayoría de los estudios existentes en la bibliografía han valorado la influencia del consumo de carne roja y de productos cárnicos de forma conjunta, probablemente porque se consideraba que ambos tenían una composición similar en cuanto a hierro hemo (Ortega et al., 1998; Gibson y Ashwell, 2003). Sin embargo, es posible que el contenido de hierro hemo de estos productos esté sobrestimado, ya que hay que tener en cuenta que en su elaboración normalmente se incorporan ingredientes procedentes de cereales (féculas, harinas, etc), que pueden aumentar el contenido de hierro total pero que no aportan hierro hemo; y además el cálculo de hierro hemo es teórico, ya que se considera que es el 40% del hierro total aportado por los alimentos de origen animal (Monsen et al., 1978).

En resumen, un mayor consumo de carne roja está asociado con niveles más elevados de ferritina, lo que indica un mejor estado de hierro. Estos resultados son controvertidos, ya que se alejan de las recomendaciones dietéticas actuales, que aconsejan disminuir el consumo de carne roja por estar asociado con efectos negativos en la salud, tales como el desarrollo de enfermedad cardiovascular o cáncer (Larsson et al., 2006; Kontogianni et al., 2008; McAfee et al., 2010). Sin embargo, las voluntarias de nuestro estudio presentaron unos niveles de colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, glucosa, presión arterial e índices de riesgo cardiovascular (colesterol total/HDL colesterol y LDL-colesterol/HDL colesterol) dentro de los rangos de normalidad, y sin diferencias significativas en función de los almacenes de hierro corporal, por lo que el aumento en el consumo de carne roja en este colectivo parece no estar asociado con un incremento en el riesgo cardiovascular. Por otro lado, y según las directrices de la *World Cancer Research Fund* (2007), el riesgo de desarrollo de cáncer en estas voluntarias con mejor estado de hierro estaría minimizado, ya que la ingesta de carne roja se encuentra por debajo de los límites recomendados (<71g/día), consumen menos productos cárnicos y utilizan métodos de cocinado de poco riesgo.

En relación a las Ingestas Dietéticas de Referencia de hierro (DRI, *Dietary Reference Intakes*) de las mujeres en edad fértil, existe bastante controversia sobre cómo evaluar la adecuación de la ingesta de hierro, debido a que los requerimientos de esta población están sesgados por las diferencias en las pérdidas de hierro originadas por la menstruación (IOM, 2000). Además, no hay un consenso sobre la Ingesta Recomendada de hierro (RDA; Recommended Dietary Allowances) para mujeres jóvenes, existiendo grandes diferencias en las recomendaciones de los diferentes países (Cuervo et al., 2009). De hecho, actualmente se están revisando las RDA a nivel Europeo (Cavelaars et al., 2010). Además, a través de la dieta habitual es difícil alcanzar la RDA de hierro, que en España para mujeres en edad fértil es de 18 mg/día (Moreiras et al., 2011). Por último, diversos estudios han observado que la modificación de la dieta habitual, con el fin de aumentar la cantidad y/o la biodisponibilidad del hierro, es insuficiente para mejorar el estado de hierro y prevenir el desarrollo de anemia ferropénica en mujeres en edad fértil con deficiencia de hierro (Tetens et al., 2007; Navas-Carretero et al., 2009a).

Por tanto, en este contexto, el uso de alimentos fortificados como parte de la dieta habitual cobra una gran relevancia en la prevención de la ferropenia. Por ello, y teniendo en cuenta por un lado los enfoques más innovadores para superar las dificultades tecnológicas de la fortificación con hierro (Zimmermann y Windhab, 2010), y por otro, los conocimientos actuales acerca de la importancia de la matriz del alimento en la biodisponibilidad del hierro (Moretti et al., 2006), se realizó un estudio incluyendo un alimento funcional en la dieta habitual de un grupo de mujeres en edad fértil con deficiencia de hierro, con objeto de valorar su eficacia. El alimento empleado fue un zumo de frutas fortificado con pirofosfato férrico micronizado encapsulado en liposomas, que aportaba 18 mg de hierro por envase (100% de las RDA para mujeres en edad fértil). Tras la realización del estudio aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo de 16 semanas de duración, se observó que la ingesta de dicho zumo fortificado, consumido como parte de la dieta habitual, mejoró claramente el estado de hierro, observándose cambios significativos en todos los parámetros de hierro analizados (hematocrito, volumen corpuscular medio, índice de distribución de hematíes, hemoglobina, zinc protoporfirina, transferrina sérica, saturación de la transferrina y el receptor soluble de la transferrina). Un resultado muy relevante fue la rápida respuesta, ya que desde la 4ª semana se observó un aumento significativo en la concentración de ferritina sérica y tras las 16 semanas la ingesta del zumo fortificado fue capaz de incrementar las reservas corporales de hierro de las mujeres participantes en un 80%. Estos resultados tan marcados se deben a la elección del pirofosfato férrico micronizado encapsulado en liposomas con cubierta de lecitina como sal fortificante, cuya elevada biodisponibilidad ha sido descrita en varios estudios (Navas-Carretero et al., 2009c; Roe et al., 2009); y también a la composición del zumo, que contenía potenciadores de la absorción de hierro (ácido ascórbico) pero no compuestos inhibidores. Este es un punto muy importante, ya que en otros estudios en los que la matriz contenía compuestos inhibidores de la absorción de hierro la eficacia del alimento funcional fue mucho menor, incluso nula (Zimmermann et al., 2005; Karl et al., 2010).

La eficacia de otros zumos de fruta fortificados con hierro también se ha demostrado en otras poblaciones con riesgo de anemia, como los niños

(Nogueira de Almeida et al., 2002). Además, este tipo de productos tiene una alta aceptación entre la población y son fáciles de introducir en la dieta habitual. Por ello, los zumos de frutas fortificados con hierro se presentan como una excelente alternativa para la mejora del estado de hierro y la prevención de la anemia ferropénica en población con riesgo de deficiencia, como mujeres embarazadas, niños, vegetarianos y mujeres en edad fértil.

La deficiencia de hierro puede ir acompañada de una serie de alteraciones metabólicas cuya repercusión funcional aún es desconocida. Diferentes estudios han planteado que la ferropenia podría estar relacionada con efectos deletéreos en el metabolismo óseo (Katsumata et al., 2006; Parelman et al., 2006; Diaz-Castro et al., 2012); por lo que otro objetivo de esta Tesis Doctoral fue conocer si el zumo fortificado, que claramente mejoró el estado de hierro, podía tener también un efecto osteoprotector. Aunque los valores de los parámetros del remodelado óseo eran normales y no se produjeron cambios durante la intervención, al inicio se encontró un alta prevalencia de deficiencia de vitamina D en el grupo de mujeres con deficiencia de hierro que participó en la intervención nutricional, existiendo una asociación positiva entre los valores de 25-hidroxivitamina D (marcador del estado de la vitamina) y la saturación de la transferrina. Además, aunque la recuperación del estado de hierro por el consumo del zumo no afectó a los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D, las mujeres que presentaban deficiencia de la vitamina respondieron peor. La posible interacción entre el hierro y la vitamina D ha sido descrita en varios estudios, aunque todavía se desconocen los mecanismos implicados (Grindulis et al., 1986; McGillivray et al., 2007; Sim et al., 2010; Imel et al., 2011). Sin embargo, dentro del contexto de salud pública, es de gran importancia tener en cuenta la elevada prevalencia de ambas deficiencias, vitamina D y hierro, encontrada en mujeres en edad fértil. El efecto negativo sobre la salud ósea es bien conocido, y aunque en nuestras voluntarias no hemos observado que el remodelado óseo esté afectado, las mujeres que durante décadas sufren deficiencia de hierro podrían tener un mayor riesgo de sufrir osteoporosis en el futuro (D'Amelio et al., 2008). Por otro lado, la vitamina D está implicada en numerosas funciones biológicas, y el hierro actúa como cofactor en su activación, por lo que una deficiencia de ambos nutrientes podría aumentar la incidencia de numerosas enfermedades

crónicas, como cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedad cardiovascular (Rojas-Rivera et al., 2010).

En consonancia con las nuevas tendencias hacia el desarrollo de la nutrición personalizada, se realizó el estudio de la posible interacción dieta-gen, valorando la respuesta a la ingesta del alimento funcional fortificado con hierro en función de la presencia o no del alelo mutado del SNP rs3811647, que como se ha discutido anteriormente, parece ser un indicativo de mayor riesgo de anemia ferropénica. Todas las voluntarias respondieron al alimento funcional reduciendo su transferrina sérica y no existió una interacción dieta-gen, aunque aquellas que presentaban el alelo mutado mantuvieron una concentración de transferrina sérica más elevada durante toda la intervención nutricional. Hay pocos estudios sobre la interacción dieta-gen en la deficiencia de hierro (Sarriá et al., 2007b), por lo que estos resultados añaden nueva información al reciente campo de la nutrigenética.

En relación a los factores fisiológicos, se sabe que las pérdidas menstruales se relacionan con mayores necesidades de este mineral y que constituyen un factor de riesgo de deficiencia de hierro en las mujeres en edad fértil (IOM, 2001). Sin embargo, la estimación de las mismas es un proceso complicado (Fraser et al., 2001), y actualmente se buscan nuevos métodos de valoración más sencillos (Mansfield et al., 2004). Conscientes de todo ello, se diseñó un cuestionario para estimar las pérdidas menstruales y conocer otros factores ginecológicos de un grupo de mujeres en edad fértil con deficiencia de hierro, con objeto de intentar conocer si existía asociación entre dichos parámetros y el estado del hierro. Se observó que las voluntarias que utilizaban anticonceptivos hormonales tenían menores pérdidas menstruales que las que no los utilizaban y que además parecían presentar un mejor estado de hierro, lo que coincide con resultados descritos por otros autores (Milman et al., 1993; Harvey et al., 2005). Sin embargo, observamos que la concentración de transferrina sérica en las mujeres que usaban anticonceptivos hormonales estaba claramente aumentada, lo que en principio no correspondería con su mejor estado de hierro. Otros autores también han observado estos resultados (Frassinelli-Gunderson et al., 1985; Casabellata et al., 2007), que podrían deberse a los estrógenos contenidos en los anticonceptivos, ya que se ha visto

en modelos animales que las hormonas esteroides pueden regular la transcripción de transferrina en hígado (McKnight et al., 1980).

Finalmente, debido al carácter multifactorial de la anemia ferropénica, se realizó el análisis conjunto de los principales factores dietéticos, genéticos y fisiológicos que coexisten en estas mujeres con predisposición a anemia. Los resultados obtenidos son muy interesantes en lo que se refiere al transporte de hierro a los tejidos, ya que hemos observado que 3 factores: la ingesta de hierro hemo, la presencia del SNP rs3811647 y el uso de anticonceptivos hormonales, explican una alta variabilidad de la transferrina sérica (38.6%) en estas mujeres. Estos factores no interaccionan entre ellos, por lo que ejercen su influencia de manera independiente teniendo un efecto acumulativo o compensatorio sobre los niveles de dicha proteína. Este estudio es el primero en el que se presenta la influencia conjunta de factores de tipo nutricional, genético y fisiológico sobre el estado de hierro en mujeres en edad fértil.

Por último, hemos de indicar que consideramos que los resultados de la presente Tesis Doctoral son prometedores y de gran interés en el área de la nutrición personalizada y de la aplicabilidad de los alimentos funcionales, e incluso podrían tener repercusiones en el ámbito de la salud pública. Además, nuestros estudios han resaltado aún más el carácter multifactorial de la anemia ferropénica, abriendo nuevas perspectivas no contempladas inicialmente. Por tanto, es importante profundizar en estos conocimientos y seguir investigando con el fin de conseguir la prevención de una de las deficiencias nutricionales más prevalentes a nivel mundial.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

PRIMERA. El estudio de asociación entre variantes genéticas y marcadores del estado de hierro muestra que cuatro SNPs, dos en el gen de la transferrina (rs3811647 y rs1799852) y otros dos en el gen del HFE (C282Y y H63D), explican el 35% de la variabilidad genética o heredabilidad de la transferrina sérica en mujeres en edad fértil. Las portadoras del alelo minoritario del SNP rs3811647 presentan mayores niveles de transferrina sérica y menores de saturación de la transferrina, lo que implicaría mayor riesgo de anemia ferropénica, aunque la presencia simultánea de los otros SNPs parece tener un efecto compensatorio. Por tanto, se propone que estas variantes genéticas podrían utilizarse como marcadores genéticos de riesgo de anemia ferropénica.

SEGUNDA. El estudio in vitro en hepatocitos revela que el SNP rs3811647, situado en el intrón 11 del gen de la transferrina, parece tener un papel modulador en la transcripción de dicha proteína. La presencia del alelo mutado supone un aumento de la expresión génica, lo que podría explicar la elevada transferrina sérica encontrada en mujeres portadoras de dicha mutación frente a las del genotipo mayoritario.

TERCERA. La ingesta de hierro total no se relaciona con ningún parámetro del estado de hierro en mujeres en edad fértil; sin embargo, la ingesta de hierro hemo, altamente biodisponible, es el principal factor dietético que condiciona los almacenes corporales del mineral. Además, el consumo de carne roja, pero no el de carne blanca ni el de productos cárnicos, se asocia con un mejor estado de hierro.

CUARTA. La ingesta, como parte de la dieta habitual, de un zumo de frutas fortificado con pirofosfato férrico microencapsulado mejora claramente el estado de hierro en mujeres con deficiencia del mineral, valorado por cambios muy significativos en todos los biomarcadores analizados. Por ello, este zumo podría utilizarse para prevenir la anemia ferropénica en grupos de riesgo, como las mujeres en edad fértil.

QUINTA. La prevalencia de deficiencia de vitamina D es muy alta en estas mujeres con deficiencia de hierro, existiendo una asociación positiva entre los valores de 25-hidroxivitamina D (marcador del estado de la vitamina) y la saturación de la transferrina. La recuperación del estado de hierro por el consumo del zumo fortificado con hierro no afecta a los niveles de 25-hidroxivitamina D ni al remodelado óseo. No obstante, el aumento del transporte de hierro a tejidos es menor en las mujeres que presentan también deficiencia de esta vitamina.

SEXTA. Cuando se valora la respuesta a la ingesta del zumo fortificado en función del SNP rs3811647 se observa que no existe interacción dieta-gen, ya que todas las mujeres mejoran su estado de hierro independientemente de su genotipo. Sin embargo, a pesar del consumo del alimento funcional, las portadoras del alelo mutado mantienen la transferrina sérica en valores superiores durante toda la intervención nutricional.

SÉPTIMA. El uso de anticonceptivos hormonales implica menores pérdidas menstruales y un mejor estado de hierro en mujeres con deficiencia de hierro, valorado a través del receptor soluble de la transferrina y del hierro sérico. Sin embargo, también se asocia con valores de transferrina sérica un 20% más elevados, lo que en lugar de relacionarse con el estado de hierro parece deberse al tratamiento hormonal.

OCTAVA. El estudio conjunto de los factores dietéticos, genéticos y fisiológicos involucrados en el estado de hierro, revela que la ingesta de hierro hemo, el SNP rs3811647 y el uso de anticonceptivos hormonales, explican el 38.6% de la variabilidad de la transferrina sérica en mujeres con predisposición a anemia ferropénica. Estos factores influyen de manera independiente, ejerciendo un efecto acumulativo o compensatorio sobre los niveles de dicha proteína

FIRST. The association study between the genetic variants and the iron status biomarkers shows that four SNPs, two in the transferrin gene (rs3811647, rs1799852) and two in the HFE gene (C282Y, H63D), explain 35% of the genetic variation or heritability of serum transferrin in menstruating women. Carriers of the minor allele of rs3811647 present higher serum transferrin levels and lower transferrin saturation, which indicates higher iron deficiency anaemia risk, although the simultaneous presence of the other SNPs appears to have compensatory effects. Therefore, it is suggested that these genetic variants might potentially be used as markers of iron deficiency anaemia risk.

SECOND. The in vitro study in hepatocytes reveals that SNP rs3811647, located in intron 11 of the human transferrin gene, appears to have a modulating role in transferrin transcription. Presence of the mutated allele enhances the genetic expression, which might explain the high serum transferrin levels observed in carriers of this mutation compared to carriers of the wild type.

THIRD. Total iron intake is not related to any iron status biomarkers in menstruating women. However, haem-iron intake, highly bioavailable, is the main dietary factor contributing to iron stores. Moreover, consumption of red meat but not white or processed meat is associated with increased iron status.

FOURTH. The consumption, as part of the habitual diet, of a fruit juice fortified with microencapsulated iron pyrophosphate clearly improves iron status in iron deficient women, as determined by highly significant changes in all of the analysed iron biomarkers. Therefore, this iron-fortified fruit juice could be used to prevent iron-deficient anaemia in population risk groups, such as women of childbearing age.

FIFTH. The prevalence of vitamin D is very high in these iron deficient women, and there is a positive association between 25-hydroxyvitamin D (marker of vitamin D status) and transferrin saturation. The recovery of iron status by consuming an iron fortified food does not affect 25-hydroxyvitamin D levels or bone remodeling. Nevertheless, the increase in iron supply to tissues is lower if the iron-deficient women also present vitamin D deficiency.

SIXTH. When the response to the intake of the iron-fortified juice is assessed taking into account SNP rs3811647, we observe that there is no diet-gene interaction, since all the women improve their iron status regardless of their genotype. However, carriers of the minor allele maintain higher serum transferrin levels throughout the intervention with the functional food.

SEVENTH. The use of hormonal contraceptives leads to reduced menstrual blood loss and improved iron status in women with iron deficiency, assessed by soluble transferrin receptor and serum iron. Nevertheless, it is also associated with 20% higher serum transferrin levels, which instead of being related to iron status appears to be due to the hormonal treatment.

EIGHTH. The overall study of dietary, genetic, and physiological factors involved in iron status, reveals that haem-iron intake, SNP rs3811647, and the use of hormonal contraception, explain 38.6% of the variability of serum transferrin in women at risk of iron deficiency anemia. These factors influence serum transferrin independently, exerting a cumulative or compensatory effect on the levels of this protein.

BIBLIOGRAFÍA

- Aisen P, Leibman A, Zweier J (1978). Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem.*253:1930–1937.
- Alexander D, Ball MJ, Mann J (1994). Nutrient intake and haematological status of vegetarians and age-sex matched omnivores. *Eur J Clin Nutr.*48(8):538-46.
- Allen KJ, Gurrin LC, Constantine CC, Osborne NJ, Delatycki MB, Nicoll AJ, et al. (2008). Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med.*358(3):221-30.
- Anderson GJ, Darshan D, Wilkins SJ, Frazer DM (2007). Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. *Biometals.*20(3-4):665-74.
- Andrews, NC (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.*341, 1986-1995.
- Andriopoulos B, Jr., Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. (2009). BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.*41(4):482-7.
- Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arijá V (2010). Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol.*89(8):767-73.
- Armah CN, Sharp P, Mellon FA, Pariagh S, Lund EK, Dainty JR, et al. (2008). L-alpha-glycerophosphocholine contributes to meat's enhancement of nonheme iron absorption. *J Nutr.*138(5):873-7.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P (2009). Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta.*1790(7):589-99.
- Arroyo-Pardo E, Vaquero MP (2008). Detección de mutaciones y su implicación en estado patológicos del hierro. En: *Genética, Nutrición y Enfermedad* Ed. Vaquero MP. Instituto Tomás Pascual y CSIC, Madrid, España. pp 189-197.
- Asakura K, Sasaki S, Murakami K, Takahashi Y, Uenishi K, Yamakawa M, et al. (2009). Iron intake does not significantly correlate with iron deficiency among young Japanese women: a cross-sectional study. *Public Health Nutr.*12(9):1373-83.
- Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.*38(5):531-9.
- Bacon BR, Britton RS (2008). Clinical penetrance of hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med.*358(3):291-2.
- Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS, Kristensen L, et al. (2003a). Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am J Clin Nutr.*77(1):173-9.

- Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Kristensen L, Jensen M, Sorensen SS, et al. (2003b). Increasing the cooking temperature of meat does not affect nonheme iron absorption from a phytate-rich meal in women. *J Nutr.*133(1):94-7.
- Baillie FJ, Morrison AE, Fergus I (2003). Soluble transferrin receptor: a discriminating assay for iron deficiency. *Clin Lab Haematol.*25(6):353-7.
- Ball MJ, Bartlett MA (1999). Dietary intake and iron status of Australian vegetarian women. *Am J Clin Nutr.*70(3):353-8.
- Basta SS, Soekirman, Karyadi D, Scrimshaw NS (1979). Iron deficiency anemia and the productivity of adult males in Indonesia. *Am J Clin Nutr.*32(4):916-25.
- Beard JL (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr.*131(2S-2):568S-79S; discussion 80S.
- Beaumont C, Delaby C (2009). Recycling iron in normal and pathological states. *Semin Hematol.*46(4):328-38.
- Beck K, Conlon CA, Kruger R, Coad J, Stonehouse W (2011). Gold kiwifruit consumed with an iron-fortified breakfast cereal meal improves iron status in women with low iron stores: a 16-week randomised controlled trial. *Br J Nutr.*105(1):101-9.
- Beguin Y (2003). Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta.*329(1-2):9-22.
- Bendich A (2001). Calcium supplementation and iron status of females. *Nutrition.*17(1):46-51.
- Benyamin B, Ferreira MA, Willemsen G, Gordon S, Middelberg RP, McEvoy BP, et al. (2009a). Common variants in Tmprss6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nat Genet.*41(11):1173-5.
- Benyamin B, McRae AF, Zhu G, Gordon S, Henders AK, Palotie A, et al. (2009b). Variants in TF and HFE explain approximately 40% of genetic variation in serum-transferrin levels. *Am J Hum Genet.*84(1):60-5.
- Berger J, Wieringa FT, Lacroux A, Dijkhuizen MA (2011). Strategies to prevent iron deficiency and improve reproductive health. *Nutr Rev.*69 Suppl 1:S78-86.
- Bermejo B, Olona M, Serra M, Carrera A, Vaque J (1996). Prevalencia de ferropenia en la poblacion laboral femenina en edad fertil. *Rev Clin Esp.*196(7):446-50.
- Bertoncini S, Blanco-Rojo R, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP, Lopez-Parra AM (2011). A novel SNaPshot assay to detect genetic mutations related to iron metabolism. *Genet Test Mol Biomarkers.*15(3):173-9.
- Beutler E, Waalen J (2006). The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? *Blood.*107(5):1747-50.
- Biebinger R, Zimmermann MB, Al-Hooti SN, Al-Hamed N, Al-Salem E, Zafar T, et al. (2009). Efficacy of wheat-based biscuits fortified with microcapsules containing ferrous sulfate and potassium iodate or a new hydrogen-reduced elemental iron: a

- randomised, double-blind, controlled trial in Kuwaiti women. *Br J Nutr.*102(9):1362-9.
- Bjorn-Rasmussen E, Hallberg L (1979). Effect of animal proteins on the absorption of food iron in man. *Nutr Metab.*23(3):192-202.
 - Bleackley MR, Wong AY, Hudson DM, Wu CH, Macgillivray RT (2009). Blood iron homeostasis: newly discovered proteins and iron imbalance. *Transfus Med Rev.*23(2):103-23.
 - Boldt, DH (1999). New perspectives on iron: an introduction. *Am J Med Sci.*318, 207-212.
 - Bothwell TH, MacPhail AP (2004). The potential role of NaFeEDTA as an iron fortificant. *Int J Vitam Nutr Res.*74(6):421-34.
 - Brissot P, Bardou-Jacquet E, Jouanolle AM, Loreal O (2011). Iron disorders of genetic origin: a changing world. *Trends Mol Med.*17(12):707-13.
 - Brune M, Rossander-Hulten L, Hallberg L, Gleerup A, Sandberg AS (1992). Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J Nutr.*122(3):442-9.
 - Cade JE, Moreton JA, O'Hara B, Greenwood DC, Moor J, Burley VJ, et al. (2005). Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. *Am J Clin Nutr.*82(4):813-20.
 - Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, et al. (2000). The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet.*25(1):14-5.
 - Camaschella C, Strati P (2010). Recent advances in iron metabolism and related disorders. *Intern Emerg Med.*5(5):393-400.
 - Carbajal A (2003). Ingestas recomendadas de energía y nutrientes. En: *Nutrición y dietética*. Eds: García-Arias MT, García-Fernández MC. Secretariado de Publicaciones y Medios Audiovisuales. Universidad de León. León, España. pp: 27-44.
 - Carson JL, Adamson JW (2010). Iron deficiency and heart disease: ironclad evidence? *Hematology/The Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program.*pp: 348-50.
 - Casabellata G, Di Santolo M, Banfi G, Stel G, Gonano F, Cauci S (2007). Evaluation of iron deficiency in young women in relation to oral contraceptive use. *Contraception.*76(3):200-7.
 - Casanovas G, Mleczko-Sanecka K, Altamura S, Hentze MW, Muckenthaler MU (2009). Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. *J Mol Med (Berl).*87(5):471-80.

- Cavelaars AE, Doets EL, Dhonukshe-Rutten RA, Hermoso M, Fairweather-Tait SJ, Koletzko B, et al. (2010). Prioritizing micronutrients for the purpose of reviewing their requirements: a protocol developed by EURRECA. *Eur J Clin Nutr.*64 Suppl 2:S19-30.
- Celsing F, Blomstrand E, Werner B, Pihlstedt P, Ekblom B (1986). Effects of iron deficiency on endurance and muscle enzyme activity in man. *Medicine and science in sports and exercise.*18(2):156-61.
- Chambers JC, Zhang W, Li Y, Sehmi J, Wass MN, Zabaneh D, et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants in TMPRSS6 associated with hemoglobin levels. *Nat Genet.*41(11):1170-2.
- Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srai SK, et al. (2008). Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut.*57(3):374-82.
- Chen W, Huang FW, de Renshaw TB, Andrews NC (2011). Skeletal muscle hemojuvelin is dispensable for systemic iron homeostasis. *Blood.*117(23):6319-25.
- Cogswell ME, Looker AC, Pfeiffer CM, Cook JD, Lacher DA, Beard JL, et al. (2009). Assessment of iron deficiency in US preschool children and nonpregnant females of childbearing age: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2006. *Am J Clin Nutr.*89(5):1334-42.
- Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, Uzel C, Berry MR (1994). Alternate iron transport pathway. Mobilferrin and integrin in K562 cells. *J Biol Chem.*269(10):7169-73.
- Cook JD, Dassenko SA, Lynch SR (1991). Assessment of the role of nonheme-iron availability in iron balance. *Am J Clin Nutr.*54(4):717-22.
- Cook JD, Reddy MB (2001). Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr.*73(1):93-8.
- Cook JD, Flowers CH, Skikne BS (2003). The quantitative assessment of body iron. *Blood.*101(9):3359-64.
- Cook JD (2005). Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.*18(2):319-32.
- Costa V, Casamassimi A, Ciccodicola A (2010). Nutritional genomics era: opportunities toward a genome-tailored nutritional regimen. *J Nutr Biochem.*21(6):457-67.
- Craig WJ (1994). Iron status of vegetarians. *Am J Clin Nutr.*59(5 Suppl):1233S-7S.
- Cuervo M, Corbalan M, Baladia E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C, et al. (2009). Comparison of dietary reference intakes (DRI) between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp.*24(4):384-414.

- D'Amelio P, Cristofaro MA, Tamone C, Morra E, Di Bella S, Isaia G, et al. (2008). Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone*.43(6):1010-5.
- Darshan D, Anderson GJ (2009). Interacting signals in the control of hepcidin expression. *Biometals*.22(1):77-87.
- De Domenico I, Lo E, Ward DM, Kaplan J (2009). Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci U S A*.106(10):3800-5.
- De Groot CP, van Staveren WA, Dirren H, Hautvast JG (1996). Summary and conclusions of the report on the second data collection period and longitudinal analyses of the SENECA Study. *Eur J Clin Nutr*.50(Suppl 2):S123-4.
- Desjardins M (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol*.3(4):280-91.
- Devalia V, Carter K, Walker AP, Perkins SJ, Worwood M, May A, et al. (2002). Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3). *Blood*.100(2):695-7.
- Diaz-Castro J, Lopez-Frias MR, Campos MS, Lopez-Frias M, Alferez MJ, Nestares T, et al. (2012). Severe nutritional iron-deficiency anaemia has a negative effect on some bone turnover biomarkers in rats. *Eur J Nutr*.51(2):241-7.
- Djeha A, Perez-Arellano JL, Hayes SL, Oria R, Simpson RJ, Raja KB, et al. (1995). Cytokine-mediated regulation of transferrin synthesis in mouse macrophages and human T lymphocytes. *Blood*.85:1036-42.
- Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. (2005). The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*.1(3):191-200.
- Dugdale AE (2006). Predicting iron and folate deficiency anaemias from standard blood testing: the mechanism and implications for clinical medicine and public health in developing countries. *Theor Biol Med Model*.3:34.
- Edgerton VR, Gardner GW, Ohira Y, Gunawardena KA, Senewiratne B (1979). Iron-deficiency anaemia and its effect on worker productivity and activity patterns. *British medical journal*.2(6204):1546-9.
- Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB (1992). Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci*. 17 (3): 119-23
- Ellis RE, Morris R, Hill AD. (1982) Bioavailability of iron and zinc in calcium-iron-phytate and calcium-zinc-phytate complexes. *Nutr Res*. 2: 319-322.
- FAO/WHO (2004). Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Eds World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2ª edición. Sun Fung, China.

- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.*13(4):399-408.
- Fernandes A, Preza GC, Phung Y, De Domenico I, Kaplan J, Ganz T, et al. (2009). The molecular basis of hepcidin-resistant hereditary hemochromatosis. *Blood.*114(2):437-43.
- Fernandes R, Phillips SF. (1982) Components of fiber bind iron in vivo. *Am J Clin Nutr.* 35: 100-6.
- Ferrari M, Mistura L, Patterson E, Sjostrom M, Diaz LE, Stehle P, et al. (2011). Evaluation of iron status in European adolescents through biochemical iron indicators: the HELENA Study. *Eur J Clin Nutr.*65(3):340-9.
- Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. (2008). Mutations in Tmprss6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet.*40(5):569-71.
- Fleming RE (2007). Hepcidin activation during inflammation: make it STAT. *Gastroenterology.*132(1):447-9.
- Foley D, Hay DA, Mitchell RJ (1986). Specific cognitive effects of mild iron deficiency and associations with blood polymorphisms in young adults. *Ann Hum Biol.*13(5):417-25.
- Fordy J, Benton D (1994) Does low iron status influence psychological functioning? *J Hum Nutr Diet.*7:127-33.
- Fraser IS, Warner P, Marantos PA (2001). Estimating menstrual blood loss in women with normal and excessive menstrual fluid volume. *Obstet Gynecol.*98(5 Pt 1):806-14.
- Frassinelli-Gunderson EP, Margen S, Brown JR (1985). Iron stores in users of oral contraceptive agents. *Am J Clin Nutr.*41(4):703-12.
- Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Murphy TL, Vulpe CD, McKie AT, et al. (2003). A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut.*52(3):340-6.
- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet.*10(4):241-51.
- Friedman A, Arosio P, Finazzi D, Kozirowski D, Galazka-Friedman J (2011). Ferritin as an important player in neurodegeneration. *Parkinsonism Relat Disord.*17(6):423-30.
- Galan P, Yoon HC, Preziosi P, Viteri F, Valeix P, Fieux B, et al. (1998). Determining factors in the iron status of adult women in the SU.VI.MAX study. *Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants.* Eur J Clin Nutr.52(6):383-8.

- Galy B, Ferring-Appel D, Kaden S, Grone HJ, Hentze MW (2008). Iron regulatory proteins are essential for intestinal function and control key iron absorption molecules in the duodenum. *Cell Metab.*7(1):79-85.
- Ganesh SK, Zakai NA, van Rooij FJ, Soranzo N, Smith AV, Nalls MA, et al. (2009). Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. *Nat Genet.*41(11):1191-8.
- Ganz T (2008). Iron homeostasis: fitting the puzzle pieces together. *Cell Metab.* 7(4):288-90.
- Ganz T (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood.*117(17):4425-33.
- Ganz T, Nemeth E (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.014.
- Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA (2009). Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.*9(3):217-27.
- García OP, Diaz M, Rosado JL, Allen LH (2003). Ascorbic acid from lime juice does not improve the iron status of iron-deficient women in rural Mexico. *Am J Clin Nutr.*78(2):267-73.
- Gibson S, Ashwell M (2003). The association between red and processed meat consumption and iron intakes and status among British adults. *Public Health Nutr.*6(4):341-50.
- Gillooly M, Bothwell TH, Torrance JD, MacPhail AP, Derman DP, Bezwoda WR, et al. (1983). The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *Br J Nutr.*49(3):331-42.
- Girelli D, Bozzini C, Roetto A, Alberti F, Daraio F, Colombari R, et al. (2002). Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. *Gastroenterology.*122(5):1295-302.
- Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K (2011). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta.* 1820(3):188-202.
- Goddard AF, McIntyre AS, Scott BB (2000). Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *British Society of Gastroenterology. Gut.*46 Suppl 3-4:IV1-IV5.
- Grantham-McGregor S, Ani C (2001). A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J Nutr.*131(2S-2):649S-66S; discussion 66S-68S.
- Grindulis H, Scott PH, Belton NR, Wharton BA (1986). Combined deficiency of iron and vitamin D in Asian toddlers. *Arch Dis Child.*61(9):843-8.
- Grondin MA, Ruivard M, Perreve A, Derumeaux-Burel H, Perthuis I, Roblin J, et al. (2008). Prevalence of iron deficiency and health-related quality of life among female students. *J Am Coll Nutr.*27(2):337-41.

- Gunsalus IC, Sligar SG, Nordlund T, Frauenfelder H (1977). Oxygen sensing heme proteins: monooxygenases, myoglobin and hemoglobin. *Adv Exp Med Biol.* 78:37-50
- Haas JD, Brownlie Tt (2001). Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J Nutr.*131(2S-2):676S-88S; discussion 88S-90S.
- Hallberg L, Rossander L (1984). Improvement of iron nutrition in developing countries: comparison of adding meat, soy protein, ascorbic acid, citric acid, and ferrous sulphate on iron absorption from a simple Latin American-type of meal. *Am J Clin Nutr.*39(4):577-83.
- Hallberg L, Brune M, Rossander L (1989). Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am J Clin Nutr.*49(1):140-4.
- Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hulten L (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.*53(1):112-9.
- Hallberg L (1998). Does calcium interfere with iron absorption? *Am J Clin Nutr.*68(1):3-4.
- Hallberg L, Hulthen L (2000). Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr.*71(5):1147-60.
- Hallberg L, Hulthen L (2002). Perspectives on iron absorption. *Blood Cells Mol Dis.*29(3):562-73.
- Han O (2011). Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics.* 3(2):103-9.
- Harju E (1988). Empty iron stores as a significant risk factor in abdominal surgery. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition.*12(3):282-5.
- Harrison PM, Arosio P (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.*1275(3):161-203.
- Harvey LJ, Armah CN, Dainty JR, Foxall RJ, John Lewis D, Langford NJ, et al. (2005). Impact of menstrual blood loss and diet on iron deficiency among women in the UK. *Br J Nutr.*94(4):557-64.
- Heath AL, Skeaff CM, O'Brien SM, Williams SM, Gibson RS (2001). Can dietary treatment of non-anemic iron deficiency improve iron status? *J Am Coll Nutr.*20(5):477-84.
- Henríquez-Sánchez P, Diaz Romero C, Rodriguez Rodriguez E, Lopez Blanco F, Alvarez Leon E, Diaz Cremades J, et al. (2000). Evaluacion bioquimica del estado nutricional de la poblacion canaria. *Arch Latinoam Nutr.*50(1 Suppl 1):43-54.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C (2010). Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 142:24-38.

- Hercberg S, Preziosi P, Galan P (2001). Iron deficiency in Europe. *Public Health Nutr.*4(2B):537-45.
- Hershko C, Ronson A (2009). Iron deficiency, *Helicobacter* infection and gastritis. *Acta Haematol.*122(2-3):97-102.
- Hertrampf E, Olivares M (2004). Iron amino acid chelates. *Int J Vitam Nutr Res.*74(6):435-43.
- Hironaka, M (2000). The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1328-1336.
- Holtzman NA (1988). Genetic variation in nutritional requirements and susceptibility to disease: policy implications. *Am J Clin Nutr.*48(6):1510-6.
- Horton S, Ross J (2003). The economics of iron deficiency. *Food Policy*; 28:51-75.
- Hotz C, Porcayo M, Onofre G, Garcia-Guerra A, Elliott T, Jankowski S, et al. (2008). Efficacy of iron-fortified Ultra Rice in improving the iron status of women in Mexico. *Food Nutr Bull.*29(2):140-9.
- Hubert N, Hentze MW (2002). Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A.*99(19):12345-50.
- Huebers HA, Finch CA (1987). The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiol Rev.*67(2):520-82.
- Huh EC, Hotchkiss A, Brouillette J, Glahn RP (2004). Carbohydrate fractions from cooked fish promote iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr.*134(7):1681-9.
- Huisman TH, Schroeder WA (1970). New aspects of the structure, function, and synthesis of hemoglobins. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci.* 1(3):471-2.
- Hunt JR (2005). Dietary and physiological factors that affect the absorption and bioavailability of iron. *Int J Vitam Nutr Res.*75(6):375-84.
- Hunt JR, Penland JG (1999). Iron status and depression in premenopausal women: an MMPI study. *Minnesota Multiphasic Personality Inventory. Behav Med.*25(2):62-8.
- Hurrell R. (1984) Bioavailability of different iron compounds used to fortify formulas and cereals: Technological problems. In: *Iron Nutrition in infancy and childhood*. Ed by A.Stekel. New York: Raven Press 147-178.
- Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.*56(3):573-8.
- Hurrell RF, Reddy M, Cook JD (1999). Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr.*81(4):289-95.
- Hurrell RF (2002) Fortification: Overcoming technical and practical barriers. *Proc J Nutr. Supplement*: 806S-812S.

- Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat MA, Cook JD (2003). Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am J Clin Nutr.*77(5):1213-9.
- Hurrell RF (2004). Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. *Int J Vitam Nutr Res.*74(6):445-52.
- Hurrell RF (2007). Linking the bioavailability of iron compounds to the efficacy of iron-fortified foods. *Int J Vitam Nutr Res.*77(3):166-73.
- Hurrell RF, Egli I (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr.* 91(5):1461S-7S.
- Hurrell RF, Ranum P, de Pee S, Biebinger R, Hulthen L, Johnson Q, et al. (2010). Revised recommendations for iron fortification of wheat flour and an evaluation of the expected impact of current national wheat flour fortification programs. *Food Nutr Bull.*31(1 Suppl):S7-21.
- Hutchinson C, Conway RE, Bomford A, Hider RC, Powell JJ, Geissler CA (2008). Post-prandial iron absorption in humans: comparison between HFE genotypes and iron deficiency anaemia. *Clin Nutr.*27(2):258-63.
- Idzerda RL, Huebers H, Finch CA, McKnight, GS (1986). Rat transferrin gene expression: tissue-specific regulation by iron deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:3723-3727.
- Imel EA, Peacock M, Gray AK, Padgett LR, Hui SL, Econs MJ (2011). Iron Modifies Plasma FGF23 Differently in Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets and Healthy Humans. *J Clin Endocrinol Metab.*96(11):3541-9.
- IOM (2000). Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment. Institute of Medicine. Press NA. Washington DC, Estados Unidos.
- IOM (2001). Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Institute of Medicine. Press NA. Washington DC, Estados Unidos.
- International HapMap Project. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> ultimo acceso, marzo 2012
- Iolascon A, De Falco L (2009). Mutations in the gene encoding DMT1: clinical presentation and treatment. *Semin Hematol.*46(4):358-70.
- Iolascon A, De Falco L, Beaumont C (2009). Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematologica.*94(3):395-408.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science.*292(5516):464-8.

- Iyer V, Farquhar C, Jepson R (2000). Oral contraceptive pills for heavy menstrual bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD000154
- Jones G, Strugnelli SA, DeLuca HF (1998). Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.*78(4):1193-231.
- Joost HG, Gibney MJ, Cashman KD, Gorman U, Hesketh JE, Mueller M, et al. (2007). Personalised nutrition: status and perspectives. *Br J Nutr.*98(1):26-31.
- Karl JP, Lieberman HR, Cable SJ, Williams KW, Young AJ, McClung JP (2010). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of an iron-fortified food product in female soldiers during military training: relations between iron status, serum hepcidin, and inflammation. *Am J Clin Nutr.*92(1):93-100.
- Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M, Suzuki K (2006). Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*70(10):2547-50.
- Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R, Wang RH, et al. (2008). Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood.*112(4):1503-9.
- Kawabata H, Yang R, Hirama T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem.*274(30):20826-32.
- Kelly AL, Rhodes DA, Roland JM, Schofield P, Cox TM (1998). Hereditary juvenile haemochromatosis: a genetically heterogeneous life-threatening iron-storage disease. *QJM.*91(9):607-18.
- Khedr E, Hamed SA, Elbeih E, El-Shereef H, Ahmad Y, Ahmed S (2008). Iron states and cognitive abilities in young adults: neuropsychological and neurophysiological assessment. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience.*258(8):489-96.
- Knott L, Bailey AJ (1998). Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone.*22(3):181-7.
- Knutson M, Wessling-Resnick M (2003). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*38(1):61-88.
- Kontogianni MD, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysoschoou C, Stefanadis C (2008). Relationship between meat intake and the development of acute coronary syndromes: the CARDIO2000 case-control study. *Eur J Clin Nutr.*62(2):171-7.
- Koulaouzidis A, Cottier R, Bhat S, Said E, Linaker BD, Saeed AA (2009). A ferritin level >50 microg/L is frequently consistent with iron deficiency. *Eur J Intern Med.*20(2):168-70.
- Kraft P, Zeggini E, Ioannidis JP (2009). Replication in genome-wide association studies. *Stat Sci.*24(4):561-73.

- Kruglyak L, Nickerson DA (2001). Variation is the spice of life. *Nat Genet.*27(3):234-6.
- Labbe RF, Dewanji A (2004). Iron assessment tests: transferrin receptor vis-a-vis zinc protoporphyrin. *Clin Biochem.*37(3):165-74.
- Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK (1999). Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clin Chem.*45(12):2060-72.
- Larsson SC, Wolk A (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer.*119(11):2657-64.
- Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT (2008). Duodenal cytochrome B expression stimulates iron uptake by human intestinal epithelial cells. *J Nutr.*138(6):991-5.
- Layrisse M, Martinez-Torres C, Leets I, Taylor P, Ramirez J (1984). Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *J Nutr.*114(1):217-23.
- Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, Beutler E (1998). The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis.*24(2):199-215.
- Letocart E, Le Gac G, Majore S, Ka C, Radio FC, Gourlaouen I, et al. (2009). A novel missense mutation in SLC40A1 results in resistance to hepcidin and confirms the existence of two ferroportin-associated iron overload diseases. *Br J Haematol.*147(3):379-85.
- Li R, Chen X, Yan H, Deurenberg P, Garby L, Hautvast JG (1994). Functional consequences of iron supplementation in iron-deficient female cotton mill workers in Beijing, China. *Am J Clin Nutr.*59(4):908-13.
- Lönnerdal B (2010). Calcium and iron absorption: mechanisms and public health relevance. *Int J Vitam Nutr Res.*80(4-5):293-9.
- Lynch SR, Cook JD. (1982). Interaction of vitamin C and iron. En: *Micronutrient interactions: vitamins, minerals and hazardous elements*. Eds: Levander OA, Cheng L. *Annals of the New York Academy of Sciences.*335:32-34.
- Lynch SR (1998) Iron. *Physiology, Dietary Sources and Requirements..* In: *Enciclopedia de Human Nutrition*. Eds. Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B. Academic Press. Londres, Reino Unido.pp: 1153-9.
- Lynch SR, Stoltzfus RJ (2003). Iron and ascorbic Acid: proposed fortification levels and recommended iron compounds. *J Nutr.*133(9):2978S-84S.
- Lynch SR (2005). The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.*18(2):333-46.
- Lynch SR (2011). Why nutritional iron deficiency persists as a worldwide problem. *J Nutr.*141(4):763S-8S.

- Ma Q, Kim EY, Han O (2010). Bioactive dietary polyphenols decrease heme iron absorption by decreasing basolateral iron release in human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr.*140(6):1117-21.
- Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA (2007). Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem J.*403(1):59-69.
- Mansfield PK, Voda A, Allison G (2004). Validating a pencil-and-paper measure of perimenopausal menstrual blood loss. *Womens Health Issues*;14(6):242-7.
- Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C (2009). HIF-2alpha, but not HIF-1alpha, promotes iron absorption in mice. *J Clin Invest.*119(5):1159-66.
- McAfee AJ, McSorley EM, Cuskelly GJ, Moss BW, Wallace JM, Bonham MP, et al. (2010). Red meat consumption: an overview of the risks and benefits. *Meat Sci.*84(1):1-13.
- McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. (2008). Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.*9(5):356-69.
- McClung JP, Karl JP, Cable SJ, Williams KW, Nindl BC, Young AJ, et al. (2009). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of iron supplementation in female soldiers during military training: effects on iron status, physical performance, and mood. *Am J Clin Nutr.*90(1):124-31.
- McCord JM (1998) Iron, free radicals, and oxidative injury. *Seminars Hematol.* 35, 5-12.
- McGillivray G, Skull SA, Davie G, Kofoed SE, Frydenberg A, Rice J, et al. (2007). High prevalence of asymptomatic vitamin D and iron deficiency in East African immigrant children and adolescents living in a temperate climate. *Arch Dis Child.*92(12):1088-93.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.*5(2):299-309.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.*291(5509):1755-9.
- McKnight GS, Lee DC, Palmiter RD (1980). Transferrin gene expression. Regulation of mRNA transcription in chick liver by steroid hormones and iron deficiency. *J Biol Chem*;255(1):148-53.

- McLaren CE, Garner CP, Constantine CC, McLachlan S, Vulpe CD, Snively BM, et al. (2011). Genome-wide association study identifies genetic Loci associated with iron deficiency. *PLoS One*.6(3):e17390.
- McNeill A, Pandolfo M, Kuhn J, Shang H, Miyajima H (2008). The neurological presentation of ceruloplasmin gene mutations. *Eur Neurol*.60(4):200-5.
- Mehansho H (2006). Iron fortification technology development: new approaches. *J Nutr*.136(4):1059-63.
- Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ (1997). Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet*;34(4):275-8.
- Metzgeroth G, Adelberger V, Dorn-Beineke A, Kuhn C, Schatz M, Maywald O, et al. (2005). Soluble transferrin receptor and zinc protoporphyrin--competitors or efficient partners? *Eur J Haematol*.75(4):309-17.
- Meynard D, Vaja V, Sun CC, Corradini E, Chen S, Lopez-Otin C, et al. (2011). Regulation of TMPRSS6 by BMP6 and iron in human cells and mice. *Blood*.118(3):747-56.
- Milman N, Rosdahl N, Lyhne N, Jorgensen T, Graudal N (1993). Iron status in Danish women aged 35-65 years. Relation to menstruation and method of contraception. *Acta Obstet Gynecol Scand*;72(8):601-5.
- Milman N (2011). Anemia-still a major health problem in many parts of the world! *Ann Hematol*. 90(4):369-77.
- Minihane AM, Fairweather-Tait SJ (1998). Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. *Am J Clin Nutr*.68(1):96-102.
- Minihane AM, Rimbach G (2002). Iron absorption and the iron binding and anti-oxidant properties of phytic acid. *International Journal of Food Science & Technology*, 37: 741-748.
- Monsen ER, Hallberg L, Layrisse M, Hegsted DM, Cook JD, Mertz W, et al. (1978). Estimation of available dietary iron. *Am J Clin Nutr*.31(1):134-41.
- Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C (2011). *Tablas de composición de alimentos*. Ediciones Pirámide. 15ª edición, Madrid, España.
- Moretti D, Zimmermann MB, Wegmüller R, Walczyk T, Zeder C, Hurrell RF (2006). Iron status and food matrix strongly affect the relative bioavailability of ferric pyrophosphate in humans. *Am J Clin Nutr*.83(3):632-8.
- Morris CM, Candy JM, Keith AB, Oakley AE, Taylor GA, Pullen RG, et al. (1992) Brain iron homeostasis. *J Inorg Biochem*. 47(3-4):257-65
- Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW (2008). Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*.28:197-213.

- Murray-Kolb LE, Beard JL (2007). Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women. *Am J Clin Nutr.*85(3):778-87.
- Murray-Kolb LE (2011). Iron status and neuropsychological consequences in women of reproductive age: what do we know and where are we headed? *J Nutr.*141(4):747S-55S.
- Nai A, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D, et al. (2011). TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood.*118(16):4459-62.
- Napier I, Ponka P, Richardson DR (2005). Iron trafficking in the mitochondrion: novel pathways revealed by disease. *Blood.*105(5):1867-74.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Schoppen S, Vaquero MP (2007a). Iron Bioavailability from pate enriched with encapsulated ferric pyrophosphate or ferrous gluconate in rats. *Food Sci Technol Int.*13(2):159-63.
- Navas-Carretero S, Sarria B, Perez-Granados AM, Schoppen S, Izquierdo-Pulido M, Vaquero MP (2007b). A comparative study of iron bioavailability from cocoa supplemented with ferric pyrophosphate or ferrous fumarate in rats. *Ann Nutr Metab.*51(3):204-7.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Carbajal A, Pedrosa MM, Roe MA, et al. (2008). Oily fish increases iron bioavailability of a phytate rich meal in young iron deficient women. *J Am Coll Nutr.*27(1):96-101.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Sarria B, Carbajal A, Vaquero MP (2009a). Iron status biomarkers in iron deficient women consuming oily fish versus red meat diet. *J Physiol Biochem.*65(2):165-74.
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Schoppen S, Vaquero MP (2009b). An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young iron-deficient women. *Br J Nutr.*102(4):546-53
- Navas-Carretero S, Perez-Granados AM, Sarria B, Vaquero MP (2009c). Iron absorption from meat pate fortified with ferric pyrophosphate in iron-deficient women. *Nutrition.*25(1):20-4.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.*306(5704):2090-3.
- Nemeth E, Preza GC, Jung CL, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T (2006). The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood.*107(1):328-33.
- Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, Vaessen N, Vergeer J, Heeringa J, et al. (2003). A population-based study of the effect of the HFE C282Y and H63D mutations on iron metabolism. *Eur J Hum Genet.*11(3):225-31.

- Nogueira de Almeida C, Crott G, Ricco R, et al. (2002) Control of iron-deficiency anaemia in Brazilian preschool children using iron-fortified orange juice. *Nutr Res* 23, 27-33.
- Oakhill JS, Marritt SJ, Gareta EG, Cammack R, McKie AT (2008). Functional characterization of human duodenal cytochrome b (Cybrd1): Redox properties in relation to iron and ascorbate metabolism. *Biochim Biophys Acta*.1777(3):260-8.
- Ohira Y, Edgerton VR, Gardner GW, Senewiratne B, Barnard RJ, Simpson DR (1979). Work capacity, heart rate and blood lactate responses to iron treatment. *Br J Haematol*.41(3):365-72.
- Olivares M, Arredondo M, Pizarro F (2010). Hierro. En: *Tratado de Nutrición*, Tomo I. Ed: Gil A. Panamericana. pp: 669-686.
- Oppenheimer SJ (2001). Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr*.131(2S-2):616S-33S; discussion 33S-35S.
- Ordovás JM, Corella D (2004). Nutritional genomics. *Annual review of genomics and human genetics*.5:71-118.
- OMS (2011). Concentraciones de ferritina para evaluar el estado de nutrición en hierro en las poblaciones. *Sistema de Información Nutricional sobre Vitaminas y Minerales*. Organización Mundial de la Salud, (OMS/NMH/NHD/MNM/11.2). Ginebra, Suiza.
- Ortega RM, Lopez-Sobaler AM, Requejo AM, Quintas ME, Gaspar MJ, Andres P, et al. (1998). The influence of meat consumption on dietary data, iron status and serum lipid parameters in young women. *Int J Vitam Nutr Res*.68(4):255-62.
- Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, et al. (2004). Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*.36(1):77-82.
- Parelman M, Stoecker B, Baker A, Medeiros D (2006). Iron restriction negatively affects bone in female rats and mineralization of hFOB osteoblast cells. *Exp Biol Med (Maywood)*.231(4):378-86.
- Pasricha SR, Flecknoe-Brown SC, Allen KJ, Gibson PR, McMahon LP, Olynyk JK, et al. (2010). Diagnosis and management of iron deficiency anaemia: a clinical update. *Med J Aust*.193(9):525-32.
- Patterson AJ, Brown WJ, Powers JR, Roberts DC (2000). Iron deficiency, general health and fatigue: results from the Australian Longitudinal Study on Women's Health. *Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation*.9(5):491-7.
- Patterson AJ, Brown WJ, Roberts DC, Seldon MR (2001). Dietary treatment of iron deficiency in women of childbearing age. *Am J Clin Nutr*.74(5):650-6.

- Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D (2008). Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur J Appl Physiol*.103(4):381-91.
- Perron NR, Brumaghim JL (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*.53(2):75-100.
- Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*.117(7):1926-32.
- Peyssonnaud C, Nizet V, Johnson RS (2008). Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle*.7(1):28-32.
- Pietrangelo A (2002) Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 282: G403-G414.
- Pietrangelo A (2004). The ferroportin disease. *Blood Cells Mol Dis*.32(1):131-8.
- Ponka P (1997). Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*.89(1):1-25.
- Ponka P, Lok CN (1999). The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*.31(10):1111-37.
- Pynaert I, Delanghe J, Temmerman M, De Henauw S (2007). Iron intake in relation to diet and iron status of young adult women. *Ann Nutr Metab*.51(2):172-81.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*; 127: 917-928.
- Ramakrishnan U, Yip R (2002). Experiences and challenges in industrialized countries: control of iron deficiency in industrialized countries. *J Nutr*.132(4 Suppl):820S-4S.
- Ramey G, Deschemin JC, Vaulont S (2009). Cross-talk between the mitogen activated protein kinase and bone morphogenetic protein/hemojuvelin pathways is required for the induction of hepcidin by holotransferrin in primary mouse hepatocytes. *Haematologica*.94(6):765-72.
- Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. (2011). Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*.53(4):1333-41.
- Rasmussen K (2001). Is There a Causal Relationship between Iron Deficiency or Iron-Deficiency Anemia and Weight at Birth, Length of Gestation and Perinatal Mortality? *J Nutr*.131(2S-2):590S-601S; discussion S-3S.
- Reddy MB, Hurrell RF, Cook JD (2000). Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. *Am J Clin Nutr*.71(4):937-43.

- Reddy S, Sanders TA (1990). Haematological studies on pre-menopausal Indian and Caucasian vegetarians compared with Caucasian omnivores. *Br J Nutr.*64(2):331-8.
- Remacha A (2011). El déficit de hierro. En: *Interrogantes y educación sanitaria para la Oficina de Farmacia*. Eds Fundación Tomás Pascual y Pilar Gómez-Cuétara, COFM y RANF. Madrid, España.pp: 123-138.
- Ridefelt P, Larsson A, Rehman JU, Axelsson J (2010). Influences of sleep and the circadian rhythm on iron-status indices. *Clin Biochem.*
- Roe MA, Collings R, Hoogewerff J, Fairweather-Tait SJ (2009). Relative bioavailability of micronized, dispersible ferric pyrophosphate added to an apple juice drink. *Eur J Nutr.*48(2):115-9.
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. (2003). Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.*33(1):21-2.
- Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J (2010) The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 25 (9):2850-2865.
- Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH (1997). Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1, *J. Biol. Chem.* 272:20055–20062.
- Ruíz Argüelles GJ (2009). *Fundamentos de hematología*. Ed. Panamericana, 4ª edición. Madrid, España.
- Sánchez C, Lopez-Jurado M, Planells E, Llopis J, Aranda P (2009). Assessment of iron and zinc intake and related biochemical parameters in an adult Mediterranean population from southern Spain: influence of lifestyle factors. *J Nutr Biochem.*20(2):125-31.
- Sarria B, López-Parra AM, Navas-Carretero S, Pérez-Granados AM, Baeza C, Arroyo-Pardo E, et al. (2007a). Hepcidin, transferrin (exon 7), and hemochromatosis genotyping suggests that haplotype block analysis is the best strategy for predicting iron deficiency phenotype in women. *Nutrition Research.*27:672-8.
- Sarria B, Navas-Carretero S, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Arroyo-Pardo E, Roe MA, et al. (2007b). The G277S transferrin mutation does not affect iron absorption in iron deficient women. *Eur J Nutr.*46(1):57-60.
- SACN (2010). *Iron and Health*. Ed TSO. Reino Unido. www.tsoshop.co.uk.
- Scientific Committee on Food (SCF) (2003). Opinion of the Scientific Committee on Food on the revision of reference values for nutrition labelling. In SCF/CS/NUT/GEN/18 Final (ed.): Bruxelles/Brussels -Belgium, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General.

- Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim SH, Gonzalez FJ (2009). Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab.*9(2):152-64.
- Sharp P, Srai SK (2007). Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol.* 21;13(35):4716-24
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*; 122: 789-801
- Siddique A, Kowdley KV (2012). Review article: the iron overload syndromes. *Aliment Pharmacol Ther.*
- Siegenberg D, Baynes RD, Bothwell TH, Macfarlane BJ, Lamparelli RD, Car NG, et al. (1991). Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am J Clin Nutr.*53(2):537-41.
- Silvestri L, Pagani A, Nai A, De Domenico I, Kaplan J, Camaschella C (2008). The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell Metab.*8(6):502-11.
- Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, et al. (2010). Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol.*89(5):447-52.
- Simovich M, Hainsworth LN, Fields PA, Umbreit JN, Conrad ME (2003). Localization of the iron transport proteins Mobilferrin and DMT-1 in the duodenum: the surprising role of mucin. *Am J Hematol.*74(1):32-45.
- Slatkin M (2008). Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet.*9(6):477-85.
- Soranzo N, Spector TD, Mangino M, Kuhnel B, Rendon A, Teumer A, et al. (2009). A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nat Genet.*41(11):1182-90.
- Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Chadud P, Lopez I, Amar M (1986). Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. *Am J Clin Nutr.*43(6):917-22.
- Storcksdieck S, Bonsmann G, Hurrell RF (2007). Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *J Food Sci.*72(1):S019-29.
- Suárez, H; Cimino, F; Bonilla, E (1985). Hierro en el sistema nervioso central: metabolismo y consideraciones fisiopatológicas. *Invest Clín*; 26: 247-322.
- Subramanian P, Rodrigues AV, Ghimire-Rijal S, Stemmler TL (2011). Iron chaperones for mitochondrial Fe-S cluster biosynthesis and ferritin iron storage. *Curr Opin Chem Biol.*15(2):312-8.
- Tanaka H, Teitelbaum SL (1990). Vitamin D regulates transferrin receptor expression by bone marrow macrophage precursors. *J Cell Physiol.*145(2):303-9.

- Tandy, S., Williams, M., Leggett, A., Lopez-Jimenez, M., Dedes, M, et al. (2000). Nramp 2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 275: 1023-1029.
- Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. (2007). High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.*13(9):1096-101.
- Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. (2009). Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood.*114(1):181-6.
- Taylor PG, Martinez-Torres C, Romano EL, Layrisse M (1986). The effect of cysteine-containing peptides released during meat digestion on iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.*43(1):68-71.
- Tenhunen R, Marver H, Pimstone NR, Trager WF, Cooper DY, Schmid R (1972). Enzymatic degradation of heme. Oxygenative cleavage requiring cytochrome P-450. *Biochemistry.*11(9):1716-20.
- Tetens I, Bendtsen KM, Henriksen M, Ersboll AK, Milman N (2007). The impact of a meat- versus a vegetable-based diet on iron status in women of childbearing age with small iron stores. *Eur J Nutr.*46(8):439-45.
- Teucher B, Olivares M, Cori H (2004). Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *Int J Vitam Nutr Res.*74(6):403-19.
- Thankachan P, Walczyk T, Muthayya S, Kurpad AV, Hurrell RF (2008). Iron absorption in young Indian women: the interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *Am J Clin Nutr.*87(4):881-6.
- The Menorrhagia Research Group (2004). Quantification of menstrual blood loss. *The Obstetrician & Gynaecologist*; 6:88–92.
- Thomas C, Thomas L (2002). Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem.*48(7):1066-76.
- Thompson BA, Sharp PA, Elliott R, Fairweather-Tait SJ (2010). Inhibitory effect of calcium on non-heme iron absorption may be related to translocation of DMT-1 at the apical membrane of enterocytes. *J Agric Food Chem.*58(14):8414-7.
- Torre MA, Rodriguez A, Saura-Calixto F. (1991) Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral bioavailability. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1:1-22.
- Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz FJ, Vaquero MP (2010). Deficiencia y sobrecarga de hierro: implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutr Hosp.*25(3):350-65.
- Trombini P, Coliva T, Nemeth E, Mariani R, Ganz T, Biondi A, et al. (2007). Effects of plasma transfusion on hepcidin production in human congenital hypotransferrinemia. *Haematologica.*92(10):1407-10.

- Tuntawiroon M, Sritongkul N, Rossander-Hulten L, Pleehachinda R, Suwanik R, Brune M, et al. (1990). Rice and iron absorption in man. *Eur J Clin Nutr.*44(7):489-97.
- Tuntipopipat S, Judprasong K, Zeder C, Wasantwisut E, Winichagoon P, Charoenkiatkul S, et al. (2006). Chili, but not turmeric, inhibits iron absorption in young women from an iron-fortified composite meal. *J Nutr.*136(12):2970-4.
- Uc A, McDonagh AF, Stokes JB (2010). Metabolism of haem in Caco-2 cells. *Exp Physiol.*95(2):296-303.
- Umbreit JN, Conrad ME, Moore EG, Desai MP, Turrens J (1996). Paraferitin: a protein complex with ferriredutase activity is associated with iron absorption in rats. *Biochemistry.*35(20):6460-9.
- Vahdat Shariatpanaahi M, Vahdat Shariatpanaahi Z, Moshtaaghi M, Shahbaazi SH, Abadi A (2007). The relationship between depression and serum ferritin level. *Eur J Clin Nutr.*61(4):532-5.
- Van Dokkum W (2003). The concept of mineral bioavailability. In: *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. Metabolic and Technological aspects.* Eds. Vaquero MP, García-Arias T, Carbajal A. Trivandrum, India, Research Signpost. pp:1-18.
- Van Thuy P, Berger J, Nakanishi Y, Khan NC, Lynch S, Dixon P (2005). The use of NaFeEDTA-fortified fish sauce is an effective tool for controlling iron deficiency in women of childbearing age in rural Vietnam. *J Nutr.*135(11):2596-601.
- Vaquero MP, Pérez-Olleros L, García-Cuevas M, Veldhuizen M, Ruiz-Roso B, Requejo A. (2000) Mineral absorption of diets containing natural carob fiber compared to cellulose, pectin and various combinations of these fibers. *Food Sci Tech Int.* 6:463-71.
- Vaquero MP (2011). La nutrición en la prevención de la deficiencia de hierro. En: *Interrogantes y educación sanitaria para la Oficina de Farmacia.* Eds Fundación Tomás Pascual y Pilar Gómez-Cuétara, COFM y RANF. Madrid, España. pp:139-146
- Vaquero MP, Blanco-Rojo R, Toxqui L (2012). Nutrición y anemia. En: *Manual Práctico de Nutrición y Salud. Alimentación para la prevención y el manejo de enfermedades prevalentes.* Eds: Carbajal A, Martínez Roldán C. Exlibris Ediciones. Madrid, España. pp: 367-376.
- Verdon F, Burnand B, Stubi CL, Bonard C, Graff M, Michaud A, et al. (2003). Iron supplementation for unexplained fatigue in non-anaemic women: double blind randomised placebo controlled trial. *BMJ.*326(7399):1124.
- Volke M, Gale DP, Maegdefrau U, Schley G, Klanke B, Bosserhoff AK, et al. (2009). Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PLoS One.*4(11):e7875.

- Wegmüller R, Zimmermann MB, Moretti D, Arnold M, Langhans W, Hurrell RF (2004). Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. *J Nutr.*134(12):3301-4.
- Wessling-Resnick M (1999) Biochemistry of iron uptake. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34,285- 314.
- West AR, Oates PS (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroenterol.*14(26):4101-10.
- Wickramasinghe RH, McIntosh EN (1974). Adrenodoxin, ferredoxins and other iron-sulphur (nonheme-iron) proteins. I. *Enzyme.*;17(4):210-26.
- Wienk KJ, Marx JJ, Lemmens AG, Brink EJ, Van Der Meer R, Beynen AC (1996). Mechanism underlying the inhibitory effect of high calcium carbonate intake on iron bioavailability from ferrous sulphate in anaemic rats. *Br J Nutr.*75(1):109-20.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2007). Food, nutrition and the prevention of cancer:A global perspective. Ed. American Institute for Cancer Research. Washington D.C., Estados Unidos.
- WHO (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- WHO/FAO (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. Eds: Allen L, de Benoist B, Dary O, Hurrell R. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Ginebra, Suiza.
- WHO (2007). Assessing the iron status of populations. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- WHO (2008). Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO Global Database on Anaemia. Eds. de Benoist B, McLean E, Agli I, Cogswell M. Ginebra, Suiza.
- Worthington MT, Cohn SM, Miller SK, Luo RQ, Berg CL (2001). Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*280(6):G1172-7.
- Worthington MT, Cohn SM, Miller SK, Luo RQ, Berg CL (2001). Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 280: G1172-G1177.
- Young SP, Bomford A, Williams R (1984). The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes. *Biochem J.* 219:505-510.
- Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH, Liu CH, Liu CK, Lin YJ, et al. (2006). FASTSNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res.*34(Web Server issue):W635-41.
- Zakin MM (1992). Regulation of transferrin gene expression. *FASEB J.* 6: 3253-3258.

- Zakin MM, Baron B, Guillou F (2002). Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene. *Dev Neurosci*;24(2-3):222-6.
- Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA (2009). A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab*.9(5):461-73.
- Zhao G, Arosio P, Chasteen ND (2006). Iron(II) and hydrogen peroxide detoxification by human H-chain ferritin. An EPR spin-trapping study. *Biochemistry*.45(10):3429-36.
- Zijp IM, Korver O, Tijburg LB (2000). Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Crit Rev Food Sci Nutr*.40(5):371-98.
- Zimmermann MB, Winichagoon P, Gowachirapant S, Hess SY, Harrington M, Chavasit V, et al. (2005). Comparison of the efficacy of wheat-based snacks fortified with ferrous sulfate, electrolytic iron, or hydrogen-reduced elemental iron: randomized, double-blind, controlled trial in Thai women. *Am J Clin Nutr*.82(6):1276-82.
- Zimmermann MB (2008). Methods to assess iron and iodine status. *Br J Nutr*.99 Suppl 3:S2-9.
- Zimmermann MB, Windhab EJ (2010). Encapsulation of Iron and Other Micronutrients for Food Fortification. En: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Eds. Zuidam, NJ, Nedovic, V. Springer, New York, pp: 187-209.